

Optimierung von Trypsinligase zur C-terminalen Modifikation von Proteinen

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Marcus Böhme

geboren am 21.07.1985 in Leipzig

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

Tag der öffentlichen Verteidigung: 19. Februar 2021

Zusammenfassung

Die ortspezifische Modifikation von Proteinen stellt ein elementares Werkzeug im Bereich der Lebenswissenschaften sowie der biotechnologischen und pharmazeutischen Industrie dar. Neben einer Vielzahl von chemischen Konjugationsstrategien konnten sich enzymkatalysierte Modifizierungsstrategien aufgrund der inhärenten Regio- und Stereoselektivität von Enzymen sowie den milden Reaktionsbedingungen etablieren. Besonders bei der Entwicklung und Produktion von Biopharmazeutika können Verfahren, welche die selektive Einführung von artifiziellen Funktionalitäten ermöglichen, zur Funktionserweiterung von therapeutischen Wirkstoffmolekülen beitragen, wodurch sich ein breites Spektrum von Anwendungsmöglichkeiten ergibt. Ein vielversprechendes Konzept von solch therapeutischen Wirkstoffmolekülen repräsentieren die Antikörper-Wirkstoff-Konjugate, welche eine zunehmend wichtige Rolle bei der zielgerichteten Behandlung diverser solider sowie nicht solider Tumorarten in der Krebstherapie spielen. Derzeit zugelassene Antikörper-Wirkstoff-Konjugate erster Generation werden durch klassische chemische Konjugationsmethoden hergestellt. Die Kopplung des Toxins an den Antikörper erfolgt hierbei an funktionelle Gruppen endogener Aminosäuren wie Lysin oder Cystein, wobei thiol- oder aminreaktive Linker eingesetzt werden. Dies führt in der Regel zu sehr heterogenen Produktspezies, welche sich aufgrund unterschiedlicher Konjugationsstellen und variierender Toxinbeladung teils erheblich hinsichtlich ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften sowie ihrer *in-vivo*-Effizienz unterscheiden. Der Fokus aktueller Forschung liegt daher in der Entwicklung und Etablierung geeigneter Konjugationsmethoden zur Herstellung homogener Antikörper-Wirkstoff-Konjugate mit verbesserter *in-vivo*-Effizienz. Neben der Weiterentwicklung chemischer Konjugationsmethoden stellt die enzymkatalysierte Proteinmodifikation einen vielversprechenden Ansatz dar. Jedoch ist die Anzahl geeigneter Enzyme stark limitiert und deren universelle sowie ökonomisch sinnvolle Anwendbarkeit wird durch intrinsische Anforderungen beschränkt.

In diesem Kontext konnte im Arbeitskreis BORDUSA ein auf Trypsin basierender vielversprechender Biokatalysator entwickelt werden, welcher als Trypsiligase bezeichnet wird. Diese rational designte Enzymvariante ermöglicht bei einer Reaktionsführung im wässrigen System eine *N*- sowie *C*-terminale Modifizierung von Proteinen. Während für die *N*-terminale Modifikation von Proteinen mittels Acyltransferreaktion quantitative Ausbeuten erzielt werden, ergeben sich bei der *C*-terminalen Proteinmodifikation mittels Transamidierungsreaktion Produktausbeuten, welche aufgrund einer intrinsischen Hydrolyseaktivität seitens Trypsiligase limitiert sind.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation ist es gelungen, die Syntheseeffizienz von Trypsilignase hinsichtlich der C-terminalen Modifikation von Proteinen durch ein evolutionäres Enzym-Engineering deutlich zu verbessern. Hierzu wurde das Phagen-Display als Selektionsverfahren zur effizienten Anreicherung verbesserter Biokatalysatoren für Trypsilignase optimiert. In Kombination mit einem eigens etablierten Hochdurchsatz-Screening ist es gelungen, zahlreiche Trypsilignase-Varianten zu identifizieren, welche verbesserte Produktausbeuten hinsichtlich der katalysierten Transamidierungsreaktion zeigten. Die vielversprechendste Trypsilignase-Variante 2G10 wurde detailliert enzymkinetisch untersucht. Neben einer vergleichenden Betrachtung der Syntheseeffizienz der Trypsilignase-Variante 2G10 und der nativen Trypsilignase anhand eines in dieser Arbeit etablierten Syntheseprofils konnten auch erste Daten zur Triebkraft der Transamidierungsreaktion gewonnen werden. Im letzten Teil der Arbeit konnte schließlich gezeigt werden, dass die Trypsilignase-Variante 2G10 ein vielversprechender Biokatalysator ist, welcher sich für die Generierung orts-spezifisch modifizierter Antikörper-Wirkstoff-Konjugate eignet. Dahingehend bietet die Trypsilignase-Variante 2G10 eine Vielzahl von wünschenswerten Eigenschaften, welche auch jenseits der Antikörper-Wirkstoff-Konjugate von hohem Interesse sind. Dies umfasst die effiziente, schnelle und ortsspezifische Modifikation eines Zielproteins anhand einer kurzen Erkennungssequenz, wobei die Konjugation im biologischen Puffersystem ohne die Notwendigkeit für Reduktionsmittel oder organische Lösungsmittel erfolgt. Zudem besitzt Trypsilignase-Variante 2G10 eine hohe Flexibilität hinsichtlich der Funktionalität, welche über das peptidische Nukleophil gekoppelt ist. Dies macht die Trypsilignase-Variante 2G10 zu einem nützlichen Werkzeug für eine Vielzahl von Anwendungen.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Definition.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Kovalente Modifizierung von Proteinen	1
1.2 Antikörper-Wirkstoff-Konjugate.....	2
1.2.1 Chemische Modifizierung	9
1.2.2 Enzymatische Modifizierung.....	13
1.3 Trypsinase	22
1.4 Evolutionäre Optimierung von Enzymen.....	27
1.5 Zielstellung der Arbeit.....	31
2 Material.....	33
2.1 Chemikalien/Reagenzien	33
2.2 Puffer und Lösungen	35
2.3 Nährmedien und Antibiotika	37
2.4 Mikroorganismen.....	38
2.5 Helferphage	39
2.6 Plasmide.....	39
2.7 DNA-Oligonukleotide	42
2.8 Peptide	43
2.9 Enzyme und sonstige Proteine.....	44
2.10 Standards und Kits.....	46
2.11 Geräte und Zubehör	46
2.12 Software.....	49
3 Methoden	50
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	50

3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	50
3.1.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>P. pastoris</i>	50
3.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
3.1.4	Agarose-Gelelektrophorese	51
3.1.5	DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen und PCR-Ansätzen.....	52
3.1.6	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung von DNA	52
3.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten	52
3.1.8	Konzentrationsbestimmung von DNA mittels UV/VIS-Spektroskopie.....	53
3.1.9	Sequenzierung von DNA.....	53
3.2	Mikrobiologische Methoden.....	53
3.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	53
3.2.1.1	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	54
3.2.1.2	Anzucht und Stammhaltung von <i>E. coli</i>	55
3.2.1.3	Rekombinante Herstellung von Fab-Fragmenten in <i>E. coli</i>	55
3.2.1.4	Zellaufschluss von <i>E. coli</i>	56
3.2.2	Kultivierung von <i>Pichia pastoris</i>	56
3.2.2.1	Herstellung elektrokompetenter <i>P. pastoris</i> -Zellen.....	57
3.2.2.2	Transformation von <i>P. pastoris</i> mit Plasmid-DNA	57
3.2.2.3	Anzucht und Stammhaltung von <i>P. pastoris</i>	57
3.2.2.4	Rekombinante Herstellung von Trypsiligase-Varianten in <i>P. pastoris</i>	58
3.3	Proteinchemische Methoden.....	58
3.3.1	Reinigung von Trypsiligase-Varianten.....	58
3.3.1.1	Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie.....	59
3.3.1.2	Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie.....	59
3.3.2	Reinigung von Fab-Fragmenten	60
3.3.2.1	Reinigung mittels Protein G-basierter Affinitätschromatographie.....	60
3.3.2.2	Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie.....	60
3.3.3	Reinigung von modifizierten Fab-Fragmenten	60

3.3.3.1	Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie.....	61
3.3.3.2	Reinigung mittels hydrophober Interaktionschromatographie	61
3.3.3.3	Reinigung mittels Protein G-basierter Affinitätschromatographie	62
3.3.3.4	Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie.....	62
3.3.4	Proteinanalytik.....	63
3.3.4.1	Konzentrationsbestimmung mittels UV/VIS-Spektroskopie.....	63
3.3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	63
3.3.4.3	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	65
3.4	Phagen-Display.....	66
3.4.1	Konstruktion eines Phagemidvektors	67
3.4.2	Erstellung einer Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek	68
3.4.3	Herstellung Trypsiligase-präsentierender Phagen.....	73
3.4.4	Durchführung der Selektion mittels Phagen-Display.....	75
3.5	<i>ELISA</i> -basiertes Screening im Hochdurchsatz	77
3.6	Methoden zur enzymatischen Charakterisierung	80
3.6.1	Hydrolysestudien.....	80
3.6.2	Transamidierungsstudien.....	82
3.6.3	Modifizierung von Antikörperfragmenten	86
3.6.4	Statistische Auswertung der Daten.....	86
4	Ergebnisse.....	87
4.1	Optimierung der Selektion mittels Phagen-Display für Trypsiligase.....	87
4.1.1	Konstruktion eines optimierten Phagemidvektors.....	87
4.1.2	Design und Konstruktion einer Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek	90
4.2	Selektion optimierter Trypsiligase-Varianten mittels Phagen-Display	93
4.3	Identifizierung optimierter Trypsiligase-Varianten.....	94
4.3.1	Etablierung eines <i>ELISA</i> -basierten Screeningsystems	94
4.3.2	Screening selektierter Biokatalysatoren im Hochdurchsatz.....	97
4.4	Charakterisierung identifizierter Trypsiligase-Varianten.....	98

4.4.1	Sequenzierung identifizierter Trypsiligase-Varianten.....	98
4.4.2	Präparative Herstellung ausgewählter Trypsiligase-Varianten	99
4.4.3	Primäre enzymkinetische Charakterisierung ausgewählter Trypsiligase-Varianten	101
4.5	Detaillierte Charakterisierung der Trypsiligase-Variante 2G10.....	102
4.5.1	Untersuchungen zur Enzymspezifität.....	102
4.5.2	Untersuchungen zur Abhängigkeit der Transamidierungsreaktion von der Nukleophilkonzentration	104
4.5.3	Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der Transamidierungsreaktion ..	107
4.5.4	Untersuchungen zur pH- sowie Zinkionenabhängigkeit der Transamidierungsreaktion	109
4.5.5	Untersuchungen zur Syntheseeffizienz der Trypsiligase-Variante 2G10 am Modellsystem.....	112
4.6	Proteinmodifizierung mit Trypsiligase-Variante 2G10.....	113
4.6.1	Präparative Herstellung von Fab-Fragmenten.....	114
4.6.2	Studien zur Modifizierung von Fab-Fragmenten mittels Trypsiligase-Variante 2G10.....	116
4.6.3	Präparative Reinigung modifizierter Fab-Fragmente.....	125
4.6.4	Studien zur Funktionalität modifizierter Fab-Fragmente	129
5	Diskussion	131
5.1	Optimierung der Rahmenbedingungen zur Anreicherung und Identifizierung verbesserter Trypsiligase-Varianten	133
5.2	Anwendung des optimierten evolutionären Enzym-Engineerings zur Selektion und Identifizierung verbesserter Trypsiligase-Varianten	136
5.3	Primäre Charakterisierung potentiell verbesserter Biokatalysatoren	140
5.4	Enzymkinetische Charakterisierung der Trypsiligase-Variante 2G10	142
5.5	Anwendungsorientierte Charakterisierung der Trypsiligase-Variante 2G10.....	152
6	Weiterführende Arbeiten und Ausblick	160
7	Literaturverzeichnis	162

Anhang	174
Danksagung.....	184
Lebenslauf	186
Publikationsliste	187
Eidesstattliche Erklärung	189

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADC	<i>antibody-drug conjugate</i>
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ADCP	<i>antibody-dependent cellular phagocytosis</i>
Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillin-Resistenz
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Axxxxnm	Extinktion bei der Wellenlänge xxx nm
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
Bz	Benzoyl
Carb	Carbenicillin
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>
CDR	<i>complementarity-determining region</i>
CF	Carboxyfluorescein
CFU	<i>cell-forming unit</i>
CV	<i>column volume</i>
CuAAC	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition
Da	Dalton
DAR	<i>drug-to-antibody ratio</i>
DBCO	Dibenzocyclooctin
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DM1	Mertansin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
xg	Erdbeschleunigung
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gl.	Gleichung
GOI	<i>gene of interest</i>
Her2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIPS	Hydrazino-iso-Pictet-Spengler
IgG	Immunglobulin G
Kan	Kanamycin
KanR	Kanamycin-Resistenz
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LibMB	Trypsinase-basierte DNA-Bibliothek mit den Positionen H40, A55, K97, L99, S190,

4Tn	Q192
MED	Trypsinase
MMAE	Minimal effektive Dosis
MMAD	Monomethyl-Auristatin E
MMAF	Monomethyl-Auristatin D
MTD	Monomethyl-Auristatin F
mTG	Maximal tolerierbare Dosis
	Transglutaminase aus <i>Streptomyces mobaraensis</i>
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
nnAS	nicht natürliche Aminosäure
p.A.	pro analysi
OD600	Optische Dichte von Zellkulturen, gemessen bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i>
PABC	4-Aminobenzoylcarbamate
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBD	Pyrrrolbenzodiazepin-Dimer
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
POI	<i>protein of interest</i>
PTM	Posttranslationale Proteinmodifikation
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
scFv	single chain fragment variable
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMCC	Succinimidyl 4-(<i>N</i> -maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat
SPAAC	<i>strain-promoted alkyne-azide cycloaddition</i>
Tab.	Tabelle
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TDC	THIOMAB-Toxin-Konjugate
Tet	Tetracyclin
TetR	Tetracyclin-Resistenz
Tm	mittlere Übergangstemperatur
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
TBS	TRIS-gepufferte Saline
vc	Valin-Citrullin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Antikörper-Wirkstoff-Konjugates sowie dessen Wirkmechanismus zur Abtötung von Krebszellen.	4
Abbildung 2: Schematische Übersicht zu chemischen Konjugationsmethoden.	8
Abbildung 3: Schematische Übersicht zu enzymatischen Konjugationsmethoden.	21
Abbildung 4: Schematische Darstellung zum rationalen Enzym-Engineering sowie zur <i>N</i> - und <i>C</i> -terminalen Modifikation von Proteinen mittels Trypsiligase.	25
Abbildung 5: Schematische Darstellung der evolutionären Selektion verbesserter Biokatalysatoren mittels Phagen-Display.	30
Abbildung 6: Übersicht zur Konstruktion eines Phagemidvektors.	68
Abbildung 7: Generierung einer Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek.	69
Abbildung 8: Schematische Darstellung des <i>ELISA</i> -basierten Hochdurchsatz-Screenings zur Identifizierung potentiell verbesserter Biokatalysatoren.	79
Abbildung 9: <i>ELISA</i> -basierte Bindungsstudien mit Trypsiligase-präsentierenden M13-Phagen.	89
Abbildung 10: Darstellung des aktiven Zentrums von Trypsiligase mit eingebundenem Substrat sowie ausgewählten Randomisierungspositionen.	91
Abbildung 11: Übersicht zur quantitativen sowie qualitativen Analyse der Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek.	92
Abbildung 12: Validierung des <i>ELISA</i> -basierten Screeningsystems im Hochdurchsatzformat.	96
Abbildung 13: Graphische Auswertung zum <i>ELISA</i> -basierten Screening im Hochdurchsatz.	97
Abbildung 14: Übersicht zum Reinigungsverlauf der Trypsiligase-Variante 2G10.	100
Abbildung 15: Ermittlung der spezifischen Erkennungssequenz für Trypsiligase-Variante 2G10.	103
Abbildung 16: Graphische Auswertung zur Abhängigkeit der durch Trypsiligase-Variante 2G10 katalysierten Transamidierungsreaktion von der Konzentration des peptidischen Nukleophils.	106
Abbildung 17: Graphische Auswertung zur Temperaturabhängigkeit der Transamidierungsreaktion für Trypsiligase-Variante 2G10.	108

Abbildung 18: Graphische Auswertung zur Abhängigkeit der durch Trypsiligase-Variante 2G10 katalysierten Transamidierungsreaktion vom pH-Wert.....	110
Abbildung 19: Graphische Auswertung zur Abhängigkeit der Transamidierungsreaktion von der Zinkionenkonzentration für Trypsiligase-Variante 2G10.	111
Abbildung 20: Vergleichende Darstellung der Synthesprofile von Trypsiligase-Variante 2G10 sowie Trypsiligase.	113
Abbildung 21: Übersicht zum Reinigungsverlauf für das Her2/neu-spezifische Fab-Fragment Anti-Her-Fab-TAAYRH-cMyc.	115
Abbildung 22: Trypsiligase-Variante 2G10-katalysierte Modifizierung des Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmentes Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc mit Carboxyfluorescein.	117
Abbildung 23: Trypsiligase-Variante 2G10-katalysierte Modifizierung des Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmentes Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc mit Carboxyfluorescein.	120
Abbildung 24: SDS-PAGE Analyse der durch Trypsiligase-Variante 2G10 katalysierten Modifizierung des Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmentes Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc mit Carboxyfluorescein.	121
Abbildung 25: Trypsiligase-Variante 2G10-katalysierte Modifizierung des Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmentes Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc mit dem Toxin DM1.....	123
Abbildung 26: Trypsiligase-Variante 2G10-katalysierte Modifizierung des TNF α -spezifischen Fab-Fragmentes Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc mit Carboxyfluorescein sowie Polyethylenglykol.	124
Abbildung 27: Präparative Reinigung des mit 5(6)-Carboxyfluorescein markierten Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmentes Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(CF) mittels hydrophober Interaktionschromatographie.	126
Abbildung 28: Präparative Reinigung des mit DM1 markierten Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmentes Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(MCC-DM1) mittels Zweischrittreinigung..	127
Abbildung 29: Präparative Reinigung des mit Polyethylenglykol modifizierten TNF α -spezifischen Fab-Fragmentes Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(PEG20k)AAK(DNP) mittels Zweischrittreinigung.	128
Abbildung 30: ELISA-basierte Bindungsanalyse für funktionalisierte Her2/neu- sowie TNF α -spezifische Fab-Fragmente.....	130

Definition

Die in dieser Arbeit untersuchten Trypsiligase-Varianten katalysieren eine Transamidierungsreaktion, bei welcher die Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediates sowohl via Aminolyse (Hauptreaktion) als auch via Hydrolyse (Nebenreaktion) stattfinden kann. Für die Aminolyse- und Hydrolysereaktion wurden apparente Wechselzahlen (k_{cat}^{app}) ermittelt, welche sich durch die Normierung der Katalysegeschwindigkeiten auf die jeweilig eingesetzte Enzymkonzentration ergeben (vgl. Gl. 5, S. 81). Diese apparenten Wechselzahlen werden im Folgenden als Aminolyse- und Hydrolysegeschwindigkeit benannt und diskutiert. Die Begrifflichkeit „apparente Wechselzahl“ ergibt sich aus der Tatsache, dass die ermittelten Wechselzahlen bei der primären Charakterisierung ausgewählter Trypsiligase-Varianten (vgl. 4.4.3, S. 101) sowie bei der detaillierten Charakterisierung der Trypsiligase-Variante 2G10 (vgl. 4.5, S. 103) nicht bei Substratsättigung gemessen wurden. Dies wiederum ist per Definition die Voraussetzung für die Bestimmung der Wechselzahl (k_{cat}). Um die unterschiedlichen Trypsiligase-Varianten, welche aufgrund von variierenden Enzymaktivitäten bei verschiedenen Enzymkonzentrationen vermessen werden mussten, direkt miteinander vergleichen zu können, wurden die entsprechenden Katalysegeschwindigkeiten auf die eingesetzte Enzymkonzentration normiert. Dies wiederum ergibt die apparenten Wechselzahlen für die Aminolyse ($k_{cat,AL}^{app}$)- sowie Hydrolysereaktion ($k_{cat,HL}^{app}$).

1 Einleitung

1.1 Kovalente Modifizierung von Proteinen

Die posttranslationale Proteinmodifikation (PTM) ist eine wichtige Strategie der Natur zur vielfältigen Erweiterung der Funktionalität von Proteinen *in vivo*. Adressiert werden funktionelle Gruppen von Seitenketten endogener Aminosäuren sowie des Peptidrückgrates, wozu sich die Natur einer Vielzahl von enzymkatalysierten Modifizierungsreaktionen wie beispielsweise der Phosphorylierung, Acetylierung, Glykosylierung, Methylierung oder auch der proteolytischen Prozessierung bedient. Solche PTMs erlauben die Regulation der Struktur, Aktivität, Lokalisation und Halbwertszeit von Proteinen sowie die Modulation von vielfältigen Protein-Liganden Interaktionen, was essentiell für eine Vielzahl von biologischen Prozessen ist.^[1]

Auch im Bereich der Lebenswissenschaften sowie der biotechnologischen und pharmazeutischen Industrie erweist sich die Proteinmodifikation als wichtiges Werkzeug zur Erschließung eines breiten Spektrums von Anwendungen.

Neben einer Vielzahl chemoselektiver Modifizierungsstrategien, wie beispielsweise der Modifizierung endogener Lysin- oder Cysteinseitenketten mittels amin- und thiolreaktiven *crosslinkern*,^[2] der *native chemical*^[3] sowie *expressed protein ligation*^[4] oder auch dem Einbau nicht natürlicher Aminosäuren mit bioorthogonal reaktiven Klickankern^[5], haben sich insbesondere enzymkatalysierte Modifizierungsstrategien, wie die im Rahmen dieser Dissertation bearbeitete Trypsinvariante Trypsiligase, aufgrund der inhärenten Regio- und Stereoselektivität von Enzymen sowie deren Arbeitsweise unter milden Reaktionsbedingungen im biologischen Puffersystem etabliert.^[6]

Die selektive Einführung molekularer Sonden, wie beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe, radioaktive Isotope oder *Spin-label*, ermöglicht vielfältige Anwendungen im Kontext der Proteomanalyse, der Aufklärung von Struktur und Funktion von Proteinen sowie der Untersuchung des individuellen Beitrags von PTMs auf die Regulation biologischer Prozesse.^[7] Auch im Bereich der Biopharmazeutika repräsentieren kovalente Modifizierungsstrategien unabdingbare Werkzeuge für die Funktionserweiterung therapeutischer Wirkstoffmoleküle. So können beispielsweise die Bioverfügbarkeit sowie *in-vivo*-Stabilität von therapeutischen Proteinen durch die kovalente Knüpfung von Polyethylenglykol (PEG) deutlich verbessert werden.^[8,9] Beispiele für zugelassene PEG-modifizierte therapeutische Proteine sind Interferon α -2a (PEGASYS[®]) zur Behandlung von Hepatitis B und C,^[10] Phenylalanin-Ammoniaklyase

(Palynziq[®]) zur Behandlung von Phenylketonurie^[11] oder auch Certolizumab Pegol (Cimzia[®]) zur Behandlung rheumatoider Arthritis^[12]. Weiterhin besteht ein großes Interesse darin, therapeutische Proteine mit artifiziellen Effektorfunktionen auszustatten, was wiederum die Entwicklung neuer Therapieansätze ermöglicht.

Insbesondere das Konzept von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (engl. *antibody-drug-conjugate*, ADC), einer der am schnellsten wachsenden Klasse von Biopharmazeutika im Bereich der Krebstherapie, erweist sich als lohnenswertes, jedoch zugleich sehr anspruchsvolles Anwendungsgebiet. Für dieses besteht ein sehr hohes Interesse an effizienten sowie ortsgerichteten Modifizierungsstrategien.^[13] Dabei ergeben sich die größten Herausforderungen für geeignete Konjugationsmethoden aus dem komplexen Aufbau der Antikörperkomponente und den physikochemischen Eigenschaften der Wirkstoffmoleküle, welche in ADCs über einen geeigneten Linker kovalent miteinander verknüpft sind.

Da ADCs ein vielversprechendes Anwendungsgebiet für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Trypsinvarianten darstellen, soll das Spektrum anwendungsorientierter Konjugationsmethoden anhand dieser Wirkstoffklasse im folgenden Kapitel aufgezeigt werden.

1.2 Antikörper-Wirkstoff-Konjugate

Ein vielversprechender Ansatz im Bereich der Krebsimmuntherapie ergibt sich aus der Kombination der Konzepte von klassischer Chemotherapie und therapeutischen Antikörpern durch eine kovalente Kopplung eines potenten Zytotoxins an einen entsprechend tumorspezifischen Antikörper. So besitzen diese als Antikörper-Wirkstoff-Konjugate bezeichneten Biopharmazeutika zusätzlich zu den für therapeutische Antikörper beschriebenen zytotoxischen Immunantworten (CDC, ADCC und ADCP) eine artifizielle zytotoxische Effektorfunktion, welche eine direkte Eliminierung von Krebszellen ermöglicht.^[14]

Der Erfolg des Konzeptes von Antikörper-Toxin-Konjugaten spiegelt sich in der derzeitigen Erprobung von mehr als 80 ADCs in klinischen Studien sowie in der Zulassung von neun Wirkstoffkonjugaten, welche in Tabelle 1 zusammengefasst sind, wieder. Durch den Antikörper-vermittelten zielgerichteten Transport des Zytotoxins zur Krebszelle lässt sich dessen therapeutischer Index verbessern, welcher das Verhältnis aus toxischer zu effektiv wirksamer Dosis darstellt.

Tabelle 1: Übersicht zugelassener Antikörper-Wirkstoff-Konjugate zur Behandlung von soliden und hämatologischen Tumoren. DAR: Durchschnittliche Beladung von Toxinen je Antikörper (engl. *drug-to-antibody ratio*)

ADC	Hersteller	Indikation	Antigen / Toxin	DAR	Ref.
Mylotarg® (Gemtuzumab ozogamicin)	Pfizer/Wyeth	Akute myeloide Leukämie (AML)	CD33 / Calicheamizin	2-3 (via Lysin)	[15-17]
Adcetris® (Brentuximab vedotin)	Seattle Genetics, Millennium /Takeda	Hodgkin-Lymphom (HL), sowie systemisch anaplastisch-großzelliges Lymphom (sALCL)	CD30 / MMAE	4 (via interchenarer Cysteine)	[18,19]
Kadcyla® (Trastuzumab emtansine)	Genentech, Roche	HER2-positiver metastasierender Brustkrebs (mBC)	HER2/neu / DM1	3,5 (via Lysin)	[20,21]
Besponsa® (Inotuzumab ozogamicin)	Pfizer/Wyeth	Akute lymphatische Leukämie (ALL)	CD22 / Calicheamizin	5-7 (via Lysin)	[22,23]
Polivy® (Polatuzumab vedotin)	Genentech, Roche	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)	CD79b / MMAE	3,5 (via interchenarer Cysteine)	[24]
Padvec® (Enfortumab vedotin)	Astellas/ Seattle Genetics	Fortgeschrittener oder metastasierender Urothelkrebs	Nectin-4 / MMAE	4 (via interchenarer Cysteine)	[25,26]
Enhertu® (Trastuzumab deruxtecan)	AstraZeneca /Daiichi Sankyo	HER2-positiver metastasierender Brustkrebs (mBC)	HER2/neu / Exatecan	8 (via interchenarer Cysteine)	[27-29]
Trodely® (Sacituzumab govitecan)	Immunomedics	Metastasierender dreifach-negativer Brustkrebs (mTNBC)	Trop-2 / SN-38	8 (via interchenarer Cysteine)	[30,31]
Blenrep® (belantamab mafodotin)	GlaxoSmithKline	Multiple Myelom	TNFRSF17 / MMAF	4 (via interchenarer Cysteine)	[32,33]

Dies ermöglicht sogar die Verwendung hochtoxischer Wirkstoffmoleküle, welche im Rahmen der klassischen Chemotherapie nicht eingesetzt werden können, da deren effektiv wirksame Dosis aufgrund fehlender Tumorspezifität oberhalb der toxischen Dosis liegt.^[34,35] Der verbesserte therapeutische Index leitet sich dabei aus einem vergrößerten therapeutischen Fenster ab, welches sich aus der Differenz der maximal tolerierbaren Dosis (MTD) sowie der minimal effektiven Dosis (MED) ergibt.^[36] Die MTD profitiert hierbei von einer Erhöhung der Tumorselektivität, die MED von einer gesteigerten zytotoxischen Wirkung.

Der schematische Aufbau eines ADCs ist in Abbildung 1A gezeigt. So wird das Toxin durch einen speziellen Linker kovalent mit dem Antikörper verknüpft, wobei Ort und Art der kovalenten Bindung durch die jeweilige Konjugationsmethode determiniert sind.

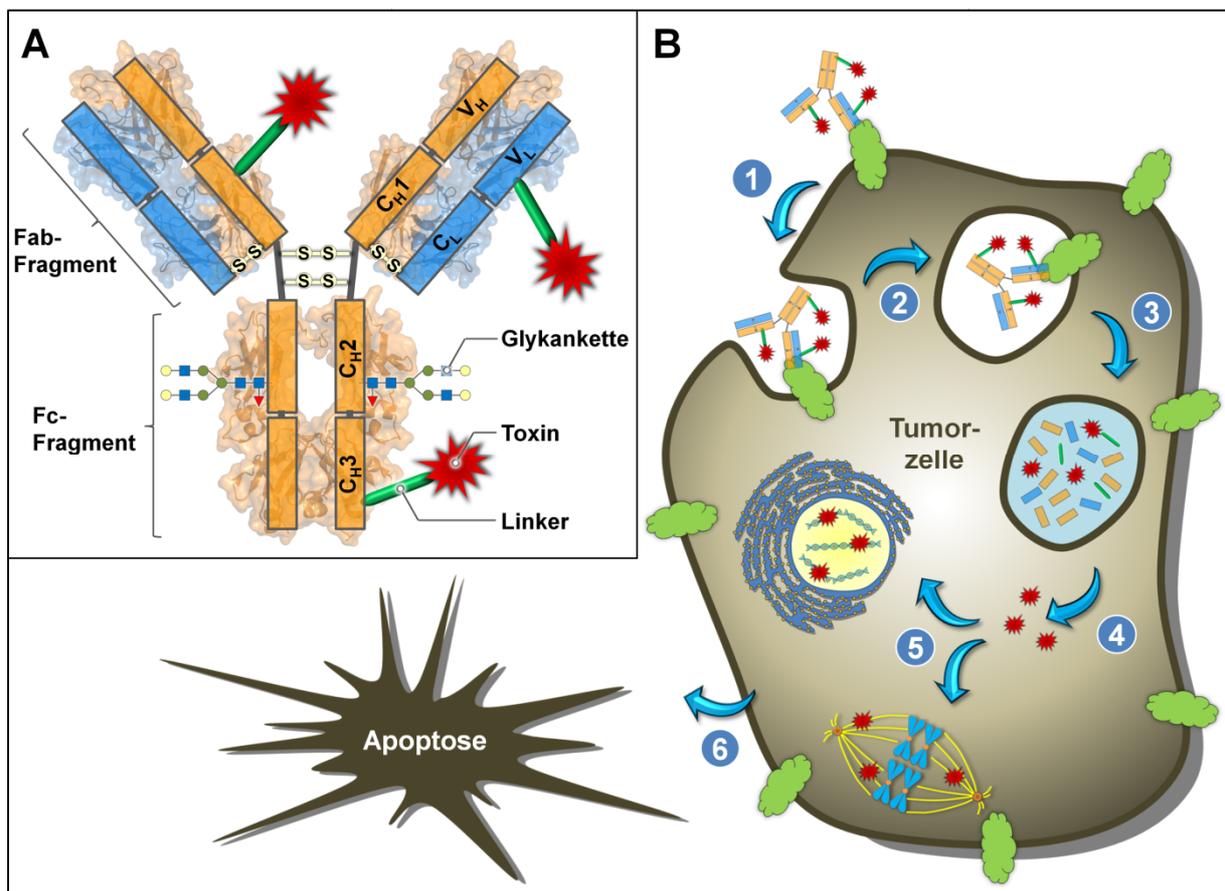


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Antikörper-Wirkstoff-Konjugates (ADC) sowie dessen Wirkmechanismus zur Abtötung von Krebszellen. A) Schematischer Aufbau eines ADC's, bei dem ein tumorspezifischer Antikörper kovalent mit einem potenten Zytotoxin über einen geeigneten Linker verknüpft wird. B) Die Bindung des ADC an das tumorspezifische Antigen (1) führt zur Internalisierung des Antigen-ADC-Komplexes (2). Das frühe Endosom mit darin befindlichem Antigen-ADC-Komplex reift zum Endolysosom (3), in welchem der ADC durch lysosomale Proteasen degradiert wird. Dies führt zur intrazellulären Freisetzung des Zytotoxins (4). Je nach Wirkstoffklasse wirkt das Zytotoxin beispielsweise inhibierend auf die Assemblierung der Mikrotubuli oder interkaliert in die DNA (5) was die Tumorzelle wiederum in die Apoptose treibt (6).

In der Regel werden ADCs intravenös appliziert und gelangen über systemische Zirkulation zu ihrem Zielort, der Krebszelle.^[37] Wie in Abbildung 1B gezeigt, bindet der als Transportvehikel eingesetzte Antikörper ein auf der Zelloberfläche lokalisiertes tumorspezifisches Antigen. Der Antigen-ADC-Komplex wird anschließend über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert und befindet sich im frühen Endosom.^[38] Dieses reift beim fortschreitenden intrazellulären Transport zum späten Endosom, welches schließlich mit einem Lysosom zum Endolysosom fusioniert. Im Endolysosom erfolgt die proteolytische Degradierung des Antikörpers durch lysosomale Proteasen, wodurch das Toxin in seiner aktiven Form freigesetzt wird. Dieses diffundiert ins Zytoplasma, wo es seine zytotoxische Wirkung entfalten kann und die Krebszelle in die Apoptose treibt. Die Wirkungsweise hängt hierbei von der Art des Toxins ab. Die meisten ADCs sind mit Toxinen ausgestattet, welche entweder die Assemblierung der Mikrotubuli inhibieren (z.B. Maytansinoide oder Dolastine) oder in die DNA der Zelle interkalieren und diese modifizieren oder schädigen (z.B. Calicheamicine, Duocarmycine oder Benzodiazepine).^[36]

Sowohl Antikörper als auch Linker und Toxin haben einen wesentlichen Einfluss auf die therapeutische Wirksamkeit und stellen somit wichtige Stellschrauben bei der Konzeption von ADCs dar.

Der Antikörper ermöglicht vornehmlich den zielgerichteten Transport des Toxins hin zur Krebszelle durch die spezifische Bindung eines auf der Zelloberfläche befindlichen tumorassoziierten Antigens. Für das adressierte Tumorantigen ergeben sich folgende Anforderungen:

- (i) es sollte selektiv auf der Oberfläche von Krebszellen präsentiert sein, sodass möglichst keine gesunden Zellen durch ADCs adressiert werden, was zu unerwünschten toxischen Nebenwirkungen führen könnte;
- (ii) die Bindung des ADCs an das Tumorantigen sollte zur endozytotischen Internalisierung des ADC-Tumorantigen-Komplexes führen, sodass das Toxin intrazellulär durch Spaltung des Linkers oder durch proteolytische Degradierung des ADC's freigesetzt wird;
- (iii) das Tumorantigen sollte in möglichst großer Kopienanzahl auf der Oberfläche der Krebszelle exponiert sein. Dies bestimmt die maximal erreichbare intrazelluläre Toxinkonzentration.^[39]

Der Antikörper selbst sollte das Tumorantigen möglichst spezifisch und mit hoher Affinität binden und über eine hohe Halbwertszeit bei der Zirkulation in der Blutlaufbahn verfügen.^[40] Desweiteren sollte er humanisiert oder humanen Ursprungs sein, um die Immunogenität des Wirkstoffkonjugates möglichst gering zu halten.^[41]

Das Toxin wiederum sollte über ein hohes zytotoxisches Potential im pikomolaren Konzentrationsbereich verfügen, da die intrazelluläre Toxinkonzentration sowohl durch die Anzahl an Antigenen, als auch durch die Anzahl konjugierter Toxinmoleküle je Antikörper limitiert wird. Zudem sollte das Toxin über eine funktionelle Gruppe verfügen, die eine kovalente Verknüpfung mit einem bifunktionalen Linker ermöglicht. Die funktionelle Gruppe sowie der Linker sollen die zytotoxische Eigenschaft möglichst nicht beeinflussen.^[42] Außerdem sollte das Toxin ausreichend wasserlöslich sowie inert gegenüber den harschen Bedingungen im Lysosom sein.^[37]

Das Toxin ist über einen Linker, welcher zwei bioorthogonale Funktionalitäten besitzt, kovalent mit dem Antikörper verknüpft. Die derzeit eingesetzten Linker werden in spaltbare und nichtspaltbare Linker klassifiziert, was sich wiederum auf die Art und Weise der intrazellulären Freisetzung des Toxins nach Internalisierung bezieht. Folgende Linker-Gruppierungen werden hauptsächlich bei spaltbaren Linkern verwendet:

- (i) säurelabile Hydrazone, welche im sauren Milieu des Lysosoms hydrolysieren,^[16]
- (ii) Disulfide, welche im Zytosol reduktiv gespalten werden^[43] und
- (iii) enzymatisch spaltbare Gruppierungen, wie beispielsweise das Dipeptid aus Valin und Citrullin, welches spezifisch durch die lysosomale Protease Cathepsin B gespalten wird,^[44] oder β -Glucuronsäure, welche ebenfalls im Lysosom durch β -Glucuronidase hydrolysiert wird.^[45]

Bei nicht spaltbaren Linkern erfolgt die Freisetzung des Toxins indirekt durch eine proteolytische Degradierung des Antikörpers im Lysosom, wobei das Toxin mit dem Linker sowie der konjugierten Aminosäure des Antikörpers verknüpft bleibt.^[46,47] Generell sollte der Linker eine möglichst hohe Stabilität während der Zirkulation im Blutkreislauf besitzen. Dies verhindert eine vorzeitige Freisetzung des Toxins und vermeidet somit eine Erhöhung der systemischen Toxizität sowie einer Verringerung des therapeutischen Fensters.^[48]

Neben dem Antikörper, dem Toxin und dem Linker beeinflusst auch die verwendete Konjugationsmethode maßgeblich die *in-vivo*-Effizienz von ADCs. Diese definiert den Ort und die Art der kovalenten Konjugation, die Anzahl der gekoppelten Toxinmoleküle je Antikörper sowie die Homogenität des finalen Konjugationsproduktes. Alle zugelassenen sowie viele in der klinischen Erprobung befindlichen ADCs werden mittels klassischer chemischer Konjugation hergestellt.^[49] Dazu werden Linker mit thiol- oder aminreaktiven Funktionalitäten verwendet, welche die Konjugation des Toxins vornehmlich an die Seitenketten endogener reduzierter Cysteine oder Lysine ermöglichen. Da Antikörper des Typs IgG1 mehr als 80 Lysine besitzen, resultiert eine Amin-basierte Konjugation in sehr heterogenen Produktgemischen. Auch

die Thiol-basierte Konjugation führt aufgrund der vier interchenaren Disulfidbrücken (und damit acht Cysteinen) oftmals zu heterogenen Produktgemischen. So besitzt das für die Behandlung von Brustkrebs zugelassene Kadcyła[®], welches über eine Amin-basierte Konjugation hergestellt wird (Abb. 2A), eine durchschnittliche Toxinbeladung je Antikörper (engl. *drug-to-antibody ratio*, DAR) von 3,5. Die tatsächliche Toxinbeladung je Antikörper variiert hierbei zwischen 0 und 8 Toxinmolekülen und ähnelt einer binomialen Verteilung, wobei Spezies mit 3 und 4 Toxinmolekülen am häufigsten vorkommen.^[50] Zudem konnte gezeigt werden, dass 78 der 88 endogenen Lysine des Antikörpers zugänglich für eine Konjugation mit dem eingesetzten NHS-aktivierten SMCC-Linker sind, was zu einem äußerst heterogenen Produktgemisch führt.^[51] Insbesondere Spezies mit hoher Toxinbeladung sowie unkonjugierter Antikörper wirken sich dabei negativ auf das therapeutische Fenster und somit auf die *in-vivo*-Effizienz aus.^[52] Eine zu hohe Toxinbeladung hat interessanter Weise einen negativen Einfluss auf die biophysikalischen sowie pharmakokinetischen Eigenschaften des Wirkstoffkonjugates, da die meisten Toxine sehr hydrophob sind. Hierdurch wird die Akkumulation des ADCs in der Leber stark erhöht, wodurch die systemische Toxizität ansteigt.^[53] Zudem können Bindungseigenschaften und Aggregationsverhalten beeinträchtigt werden. Antikörperspezies ohne Toxin konkurrieren zudem mit toxinbeladenen Wirkstoffkonjugaten um Antigenbindungsstellen und verschlechtern somit die minimal wirksame Dosis.^[49] Desweiteren hat die Konjugationsstelle am Antikörper einen wesentlichen Einfluss auf die Linkerstabilität, vor allem bei thiolreaktiven Maleimid-basierten Linkern.^[54,55] Die Konjugation an reduzierte Cysteine von interchenaren Disulfidbrücken, welche die beiden schweren Ketten sowie jeweils leichte und schwere Kette eines Antikörpers verbrücken, bietet generell die Möglichkeit, homogenere Produktgemische zu erhalten, da sich bei der vollständigen Reduktion der vier interchenaren Disulfidbrücken eines IgG1-Antikörpers acht potentielle Konjugationsstellen ergeben.^[56] Für das zugelassene ADC Adcetris[®] (Brentuximab vedotin), welches via Cysteinkonjugation hergestellt wird (Abb. 2B), liegt der DAR jedoch bei 4. Diese durchschnittliche Toxinbeladung stellt einen Kompromiss aus zytotoxischer Aktivität sowie pharmakokinetischen Eigenschaften dar. Eine vollständige Beladung mit 8 Toxinen je Antikörper führt aufgrund des zuvor genannten Sachverhaltes zu Wirkstoffkonjugaten mit verringertem therapeutischen Fenster führen.^[52] Es konnte gezeigt werden, dass Konjugate mit einer Beladung von 4 Toxinen den höchsten therapeutischen Index besaßen. Jedoch wird ein durchschnittlicher DAR von 4 bei Cysteinkonjugation nur durch eine partielle Reduktion der Disulfidbrücken erreicht, wobei eine große Anzahl an Konstitutionsisomeren mit variierenden Beladungen von 0, 2, 4, 6 und 8 Toxinen entstehen.

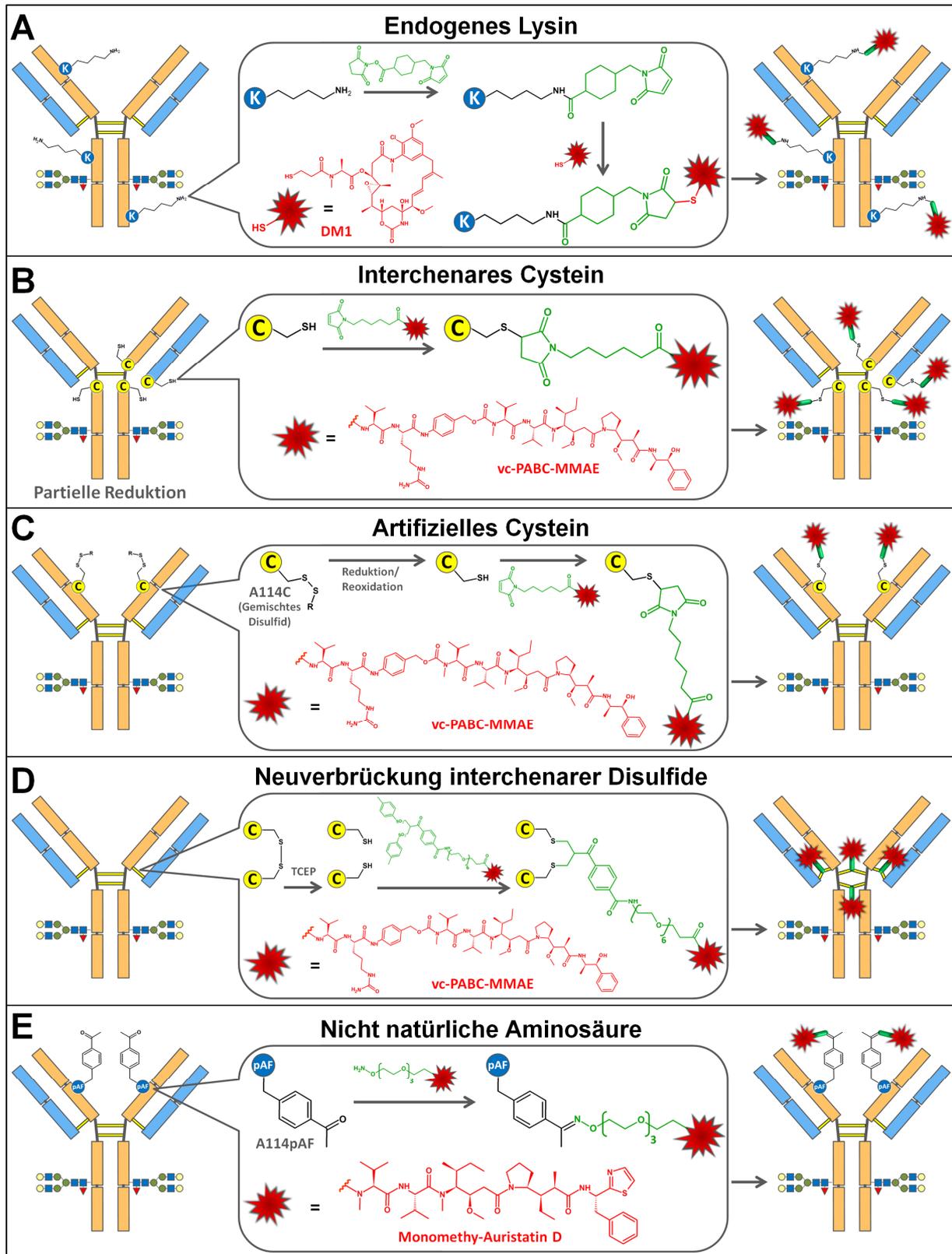


Abbildung 2: Schematische Übersicht zu chemischen Konjugationsmethoden. A) Modifikation endogener Lysinseitenketten mittels aminreaktiver *cross*-Linker.^[21] B) Modifikation von Seitenketten interchainerer Cysteine mittels thiolreaktiver *cross*-Linker.^[57] C) Modifikation von künstlich eingeführtem Cystein mittels thiolreaktiver *cross*-Linker. D) Modifikation durch Neuverbrückung interchainerer Disulfide am Beispiel eines thiolreaktiven Bis-Sulfon-Linkers.^[58] E) Modifikation eines Antikörpers durch den Einbau nicht natürlicher Aminosäuren (nnAS) am Beispiel von *p*-Acetyl-Phenylalanin (pAF) an Aminosäureposition A114 der schweren Kette.^[59]

Diese wiederum können variierende *in vivo* Effizienzen besitzen. Da die interchenaren Disulfidbrücken zur Stabilität sowie strukturellen Integrität des Antikörpers beitragen, könnte deren Spaltung ebenfalls zu einer verminderten *in-vivo*-Effizienz führen.^[60–62]

Der Fokus derzeitiger Forschung liegt in der Entwicklung und Etablierung geeigneter Konjugationsstrategien, welche eine Herstellung homogener ADCs mit verbesserter *in-vivo*-Effizienz ermöglichen.

Neben der Neu- und Weiterentwicklung chemischer Konjugationstechniken gibt es ein großes Interesse an der Etablierung enzymatischer sowie chemoenzymatischer Konjugationstechniken, da Enzyme aufgrund ihrer nativen Regio- und Stereoselektivität eine ortsspezifische Proteinmodifikation ermöglichen. Im Folgenden sollen vielversprechende chemische und enzymatische Methoden vorgestellt werden, welche zur Generierung homogener ADCs eingesetzt werden können.

1.2.1 Chemische Modifizierung

Die Neu- und Weiterentwicklung chemischer Konjugationsmethoden konzentriert sich im Wesentlichen auf die Modifikation endogener oder artifiziell eingeführter Cysteine sowie nichtnatürlicher Aminosäuren.

Eliminierung interchenarer Disulfidbrücken

Einer der ersten Ansätze zur Verminderung der Produktheterogenität bei Cystein-basierter Konjugationsstrategie lag in der Eliminierung interchenarer Disulfidbrücken durch Mutation entsprechender Cysteine zu Serinen, sodass nach Reduktion verbliebener Disulfidbrücken eine verminderte Anzahl freier Thiolgruppen für die anschließende Alkylierungsreaktion zur Verfügung stehen. Diesem Ansatz folgend mutierten McDONAGH *et al.* 4 bzw. 6 von 8 Cysteinen innerhalb des CD30-spezifischen Antikörpers cAC10, sodass 2 oder 4 Thiolgruppen nach vollständiger Reduktion der interchenaren Disulfidbrücken vorlagen.^[63] Diese konnten vollständig via proteaselabilem Maleimid-basierten Linker mit dem Toxin Monomethyl-Auristatin E (mal-vc-PABC-MMAE) modifiziert werden, wobei homogene ADCs mit DAR2 und DAR4 erhalten wurden. Diese wurden hinsichtlich ihrer *in vivo* Eigenschaften mit konventionell modifizierten cAC10 ADCs verglichen, welche einen durchschnittlichen DAR von 2 und 4 besaßen. Hierbei zeigte sich, dass die korrespondierenden homogenen sowie heterogenen ADCs mit DAR 2 und DAR 4 vergleichbare Ergebnisse bei Pharmakokinetik, Antitumoraktivität sowie MTD erzielten.^[63] Möglicherweise ist die ausbleibende Verbesserung der

in-vivo-Effizienz bei den homogenen ADCs in der fehlenden kovalenten Verbrückung der schweren oder leichten Ketten begründet, was wiederum einen Einfluss auf die Quartärstruktur des Antikörpers und damit auf dessen Funktionalität und Effektorfunktion haben könnte.^[64,65]

Artifizielle Cysteine

Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der Cystein-basierten Konjugation liegt in der gezielten Einführung artifizieller Cysteine, welche eine ortsspezifische Modifikation mit definierter Toxinbelastung ermöglichen (Abb. 2C). Vorteil dieser Methode ist der Erhalt der interchenaren Disulfidverbrückung. Eine wesentliche Herausforderung liegt in der Auswahl von Aminosäurepositionen, welche sich für eine Mutation zu reaktiven Cysteinen eignen, ohne dabei Struktur und Funktionalität des Antikörpers zu beeinflussen. Zur Identifizierung geeigneter Substitutionsstellen entwickelten JUNUTULA *et al.* das *ELISA*-basierte Screeningsystem PHESELECTOR (*Phage ELISA for Selection of Reactive Thiols*), bei dem ein Her2/neu-spezifisches Fab-Fragment (4D5) als Fusionsprotein mit dem Phagenhüllprotein pIII auf der Oberfläche des M13-Phagen präsentiert wird.^[66] In der konstanten Domäne der leichten und schweren Kette des Fab-Fragmentes wurden oberflächen-exponierte sowie lösungsmittelzugängliche Alanine, Serine sowie Valine zu Cystein mutiert. Mittels PHESELECTOR konnten die Fab-Varianten, welche als ThioFabs bezeichnet werden, hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Antigenbindung sowie der Reaktivität des artifiziellen Cysteins analysiert werden. Mit dieser Methode konnten Positionen identifiziert werden, welche keinen Einfluss auf die Antigenbindung zeigten und eine hohe Effizienz bei der Alkylierung durch Biotin- oder Alexa Fluor 488-beladene Maleimide aufwiesen.^[66]

In Folgearbeiten sollten identifizierte Cysteinsubstitutionen auf Vollängenantikörper (THIOMABs) übertragen werden und schließlich zur Generierung homogener THIOMAB-Toxin-Konjugate (TDC) dienen.^[67] Solche TDCs mit artifiziellen Cysteinen im Bereich der Fab-Region werden im Rahmen der THIOMAB-Technologie durch die Firma Genentech hergestellt. Als vielversprechend stellte sich die Substitution A114C (Kabat-Nummerierung) der schweren Kette heraus. Diese wurde in einen MUC16-spezifischen Antikörper eingeführt, wobei sich zeigte, dass das artifizielle Cystein nach Herstellung und Reinigung als gemischtes Disulfid mit freiem Cystein oder Glutathion vorliegt. Um ein freies Thiol des artifiziellen Cysteins zu erhalten, musste der Thiomab zunächst vollständig mittels TCEP reduziert werden. Es folgte eine Reoxidation mittels Dehydroascorbinsäure, wobei A114C in reduzierter Form verblieb und somit für die Konjugation zur Verfügung stand. Anschließend erfolgte die

Maleimid-basierte Konjugation des Toxins MMAE, wobei ein homogener TDC mit einem DAR von 2 generiert werden konnte. Für eine Beurteilung der *in-vivo*-Effizienz wurde ein anti-MUC16-ADC durch konventionelle Konjugation an interchenare Cysteine hergestellt, wobei dieser heterogene ADC einen durchschnittlichen DAR von 3,1 besaß. Trotz geringerer Toxinbeladung zeigte der TDC in Xenograft-Studien eine vergleichbare Antitumoraktivität wie der konventionelle ADC bei äquivalenter Antikörpermenge. Zudem zeigte der TDC eine deutliche Verbesserung hinsichtlich seiner Pharmakokinetik sowie MTD und somit ein verbessertes therapeutisches Fenster.^[67] Vergleichbare Ergebnisse wurden mit einem weiteren TDC erzielt, welcher ein Konjugat aus Trastuzumab und DM1 darstellte. Dieser wurde mit einem konventionell hergestellten ADC verglichen, wobei die Konjugation des DM1 an endogene Lysine des Trastuzumab via SMCC-Linker erfolgte und somit dem therapeutisch zugelassenen Kadcylo[®] gleicht.^[68] Eine weitere Verbesserung für den Trastuzumab-DM1 TDC wurde durch Einführung eines weiteren artifiziellen Cysteins (Mutation V205C) erreicht. Dies ermöglicht die Herstellung eines TDCs mit einem DAR von 4. In Kombination mit einem verbesserten Linkerkonzept zeigte dieses Konstrukt eine noch höhere *in vivo* Effizienz im Vergleich zu Kadcylo[®]. Neben der THIOMAB-Technologie, welche sich auf artifizielle Cysteine in der Fab-Region beschränkt, werden auch artifizielle Cysteine im Fc-Fragment eines Antikörpers (z. B.: S239C und S442C) für eine ortsgerichtete Modifikation eingesetzt.^[69,70]

Neuverbrückung interchenarer Disulfide

Eine Variante der Cystein-basierten Konjugation, die ohne Antikörper-Engineering auskommt, basiert auf der Neuverbrückung der interchenaren Disulfidbrücken durch bisalkylierende Linker verschiedenster Formate (Abb. 2D). Diese *crosslinking*-Strategien basieren im Wesentlichen auf derivatisierten Dithiophenylmaleimid-,^[62,71] Dibromomaleimid-,^[72] Dibromopyrazindion-^[73] sowie Bis-Sulfon-Linkern^[58,74]. Bei vollständiger Reduktion der interchenaren Disulfidbrücken eines IgG1 Antikörpers resultiert die Neuverbrückung in ADCs mit einem DAR von 4, wobei eine verringerte Beladung durch eine partielle Reduktion erreicht werden kann.^[58]

Im Allgemeinen liegt die Ausbeute der DAR4-Spezies zwischen 60-90 %. Neben Spezies mit DARs kleiner 4 werden im Reaktionsgemisch auch Spezies mit einem DAR von 5 gefunden, was wiederum bedeuten könnte, dass auch intrachenare Disulfidbrücken neuverbrückt werden.^[62,72,73] Zudem scheint der Erhalt der interchenaren Disulfidverbrückung nicht immer möglich zu sein, da auch Spezies mit intrachenarer Neuverbrückungen gefunden wurden, welche zu halben Antikörpern führen.^[72,75] Für Maleimid-basierte *crosslinker* ergibt sich zu-

dem die Notwendigkeit, das Maleimid nach Neuverbrückung zur stabileren Maleinsäure zu hydrolysieren, da es *in vivo* zu Thiolaustauschreaktionen mit freiem Cystein, Glutathion oder Albumin und somit zur vorzeitigen Freisetzung des Toxins kommen könnte.^[62]

Hinsichtlich der *in vivo* Effizienz konnte insbesondere für den Dibromomaleimid-Linker eine deutliche Verbesserung gezeigt werden. Hierbei wurde Trastuzumab mit Monomethyl-Auristatin F (MMAF) modifiziert, wobei die Konjugation durch Bisalkylierung mittels Dibromomaleimid-MMAF oder durch konventionelle Monoalkylierung mittels Maleimidocapryl-MMAF erfolgte. Im Vergleich zum konventionellen heterogenen ADC bewirkte der neuverbrückte ADC im Xenograft-Mausmodell eine ausgeprägtere Tumorregression. Auch Studien zur Pharmakokinetik und MTD zeigten eine deutliche Verbesserung, sodass sich hieraus ein vergrößertes therapeutisches Fenster ergibt.^[76]

Nicht natürliche Aminosäuren

Durch den Einbau nicht natürlicher Aminosäuren (nnAS) in die schweren oder leichten Ketten von Antikörpern ist es möglich, artifizielle bioorthogonale Funktionalitäten für eine ortsspezifische Konjugation bereitzustellen (Abb. 2E). Ein Vorteil gegenüber der Cysteinbasierten Konjugation liegt in der Vielzahl einführbarer Funktionalitäten, wie beispielsweise Azide, Alkine oder Ketone. Dadurch wird ein breites Repertoire von Klickreaktionen ermöglicht, was unter anderem auch eine simultane Konjugation verschiedener Toxine mit unterschiedlichen Wirkmechanismen erlaubt.^[77] Auch kann die für die Cysteinkonjugationen beschriebene Maleimid-assoziierte Linkerlabilität umgangen werden.^[78] Der Einbau von nnAs erfolgt in der Regel durch eine Erweiterung des genetischen Codes via Suppression eines Amber-Stopcodons bei der ribosomalen Proteinbiosynthese. Ermöglicht wird dies durch Verwendung einer genetisch codierten artifiziellen tRNA, die durch eine korrespondierende Aminoacyl-tRNA-Synthetase mit der nnAS beladen wird und komplementär zum Basentriplett des Amber-Stopcodons (UAG) ist.^[79]

Die Herstellung von nnAS-beladenen Antikörpern kann im zellfreien oder eukaryotischen Expressionssystem erfolgen. So hat die Firma Sutro Biopharma eine zellfreie Expressionsplattform zur Generierung homogener ADCs entwickelt, wobei S136 der schweren Kette gegen die nnAS *p*-Azidomethyl-Phenylalanin (pAMF) ausgetauscht wurde. Die Proteinbiosynthese erfolgt durch eine *in-vitro*-Transkription/Translation auf Basis eines *E. coli*-Zellextraktes, wobei für den Einbau von pAMF eine eigens entwickelte Variante einer Tyrosyl-tRNA-Synthetase sowie Amber-Suppressor-tRNA aus *M. jannaschii* verwendet wurde.^[80] Auf Basis dieser Expressionsplattform konnten ZIMMERMANN *et al.* Trastuzumab mit

S136pAMF Substitution herstellen,^[81] wobei der Antikörper jedoch aglykosyliert vorlag, was wiederum einen Einfluss auf dessen Stabilität und Effektorfunktion haben kann.^[82] Anschließend erfolgte die Konjugation von Monomethyl-Auristatin F (MMAF) via Dibenzocyclooctin (DBCO)-Linker durch eine Kupfer-freie „*strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*“ (SPAAC)-Klickreaktion, wobei ein DAR von 1,9 erzielt werden konnte. Der erhaltene ADC zeigte *in vitro* eine hohe zytotoxische Aktivität, die *in-vivo*-Effizienz wurde nicht getestet.^[81] Die Firma Ambrx nutzt im Rahmen ihrer Eucode-Technologie ein auf CHO-Zellen basierendes Expressionssystem, welches den Einbau der nnAS *p*-Acetyl-Phenylalanin (pAF) in Antikörper ermöglicht. TIAN *et al.* inkorporierten pAF an der Position S115 der schweren Kette eines Anti-5T4-Antikörpers sowie an der Position A114 der schweren Kette von Trastuzumab.^[59] Die Konjugation des Toxins Monomethylauristatin D erfolgte durch einen Alkoxyamin-Linker, welcher mit der Ketogruppe der pAF-Seitenkette ein stabiles Oxim ausbildet, wobei für die Reaktion jedoch ein saures Milieu (pH 4) und eine Inkubationszeit von 40-60 h erforderlich ist.

Hinsichtlich der *in-vivo*-Effizienz erfolgte ein direkter Vergleich mit konventionell hergestellten ADCs (Maleimid-basierte Konjugation interchenarer Cysteine), wobei die nnAS-basierten ADCs deutlich bessere Resultate im Xenograft Tumormodell, der Pharmakokinetik sowie der MTD zeigten. Für den Trastuzumab-basierten ADC erfolgte zudem ein Vergleich mit dem THIOMAB-A114C, welcher ebenfalls mit MMAD derivatisiert wurde. Auch hier zeigte der nnAS-ADC eine höhere Effizienz im Xenograft Mausmodell, als der TDC. Darüber hinaus ermöglicht die Verwendung von nnAS die Konjugation von hochpotenten Pyrrolbenzodiazepin-Dimeren (PBDs), welche aufgrund ihrer Hydrophobizität bei konventioneller Konjugation zu Aggregation des ADCs führen können.^[83]

So konnten VANBRUNT *et al.* die nnAS N^6 -[(2-Azidoethoxy)carbonyl]-Lysin an Position H274 der schweren Kette von Trastuzumab einbauen.^[84] Die Konjugation eines Alkin-derivatisierten PBD-Dimers erfolgte via Kupfer-katalysierter Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC) und resultierte in einem DAR von 1,8. Der PBD-ADC zeigte im Xenograft Mausmodell im Vergleich zu einem mit Auristatin F beladenen ADC eine deutlich erhöhte Antitumoraktivität.

1.2.2 Enzymatische Modifizierung

Für die Generierung homogener ADCs stellt die enzymkatalysierte Proteinmodifikation eine vielversprechende Strategie dar, da Enzyme aufgrund ihrer nativen Regio- sowie Stereoselek-

tivität eine zielgerichtete Kopplung gewünschter Funktionalitäten unter milden Reaktionsbedingungen ermöglichen. Jedoch ist die Anzahl geeigneter Enzyme, welche eine Ligation zweier funktioneller Gruppen katalysieren, stark limitiert und deren universelle sowie ökonomisch sinnvolle Anwendbarkeit wird teilweise durch intrinsische Anforderungen beschränkt.

Sortase A

Bei Sortasen handelt es sich um eine Familie von Membran-assoziierten bakteriellen Enzymen, welche eine ausgeprägte Transpeptidaseaktivität besitzen. Natürlicherweise katalysieren sie bei gram-positiven Bakterien unter anderem die kovalente Verknüpfung von diversen Oberflächenproteinen in der Peptidoglykanschicht, die zumeist eine wichtige Rolle für die bakterielle Virulenz spielen. Sortase A aus *Staphylococcus aureus* ist das am besten charakterisierte Enzym aus der Familie der Sortasen.^[85] Es katalysiert die Verknüpfung von Oberflächenproteinen, welche am C-Terminus mit dem Erkennungsmotiv LPXTG (X steht für jede beliebige Aminosäure) ausgestattet sind. Nach Einbindung des Substrates wird die Peptidbindung zwischen Threonin und Glycin gespalten. Hierbei wird das Carbonyl-C-Atom des Threonins nukleophil von der reaktiven Thiolgruppe des Cys184 angegriffen, welches Bestandteil der katalytischen Triade (Arg197-His120-Cys184) von Sortase A ist.^[86] Durch Ausbildung einer Thioesterbindung entsteht ein kovalentes Acyl-Enzym-Intermediat. Anschließend wird unter Ausbildung einer neuen Peptidbindung der Acylrest auf die N-terminale α -Aminogruppe eines Pentaglycins von Lipid II übertragen, welches ein Vorläufermolekül bei der Zellwandsynthese ist.^[87]

Der biotechnologische Nutzen von Sortase A zur spezifischen Modifikation von Proteinen wurde erstmals 2004 durch MAO *et al.* gezeigt.^[88] Es konnte ein Derivat des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), welches am C-Terminus mit der Erkennungssequenz LPETG ausgestattet wurde, mit verschiedensten Glycin-haltigen Nucleophilen modifiziert werden, wobei die Anzahl der N-terminalen Glycine zwischen 1 und 5 variierte. Seitdem wurden eine Vielzahl von Sortase-basierten Anwendungen publiziert, welche beispielsweise die N- und C-terminale Modifikation von Proteinen, die Zyklisierung sowie Immobilisierung von Proteinen oder auch die Modifikation von Oberflächenproteinen auf Zellen oder Viruspartikeln umfassen.^[89–92]

Auch die Modifizierung von Antikörpern und deren Fragmenten mit unterschiedlichen Funktionalitäten konnte erfolgreich gezeigt werden.^[93–96] Für die Sortase-katalysierte Generierung von ADCs hat die Firma NBE-Therapeutics ihre patentierte SMAC-Technology™ (*sortase-enzyme mediated antibody conjugation*) entwickelt (Abb. 3A).

Im Rahmen der SMAC-Technology™ zeigten BEERLI *et al.* die Generierung homogener modifizierter ADCs am Beispiel von Trastuzumab sowie cAc10 (Brentuximab) durch eine Konjugation des Toxins Maytansin, respektive MMAE, als Pendant zu den zugelassenen ADCs Kadcyła® und Adcetris®.^[97] Hierbei wurde der C-Terminus von schwerer und leichter Kette mit der Erkennungssequenz LPETG ausgestattet, wodurch ADCs mit einem DAR von 4 generiert wurden. Für die Konjugation kam eine verbesserte Sortase A-Variante zum Einsatz, welche eine erhöhte katalytische Effizienz besitzt.^[98] Als Nukleophil wurde ein Pentaglycinpeptid verwendet, welches am C-Terminus mit dem entsprechenden Toxin beladen wurde. Im Falle des MMAE-tragenden Nukleophils wurde zusätzlich das Cathepsin B-sensitive Dipeptid Valin-Citrullin (vc) mit selbst spaltendem PABC-Linker (4-Aminobenzoylcarbamate) zwischen Toxin und Pentaglycin eingefügt. Die Konjugation erfolgte mit 20 Äquivalenten je Antikörper (entsprechend 5 Äquivalente je Erkennungssequenz). Dabei betrug der DAR nach Reinigung 3,18 für cAc10-vc-PABC-MMAE und 3,28 für Trastuzumab-Maytansin, was einer Syntheseeffizienz von 76 % bzw. 82 % entspricht. *In vitro* zeigten die mittels SMAC-Technology™ hergestellten ADCs vergleichbare Antitumoraktivitäten wie Kadcyła® und Adcetris®. Trastuzumab-Maytansin wurde zudem *in vivo* im Xenograft-Tumormausmodell untersucht, wobei sich auch hier eine vergleichbare Effizienz wie bei Kadcyła® ergab.^[97] Desweiteren konnte gezeigt werden, dass auch ADCs mit noch potenteren Toxinen, wie beispielsweise dem DNA-interkalierenden Anthracyclinderivat PNU-159682, via SMAC-Technology™ generiert werden können.^[99] Diese zeigen *in vivo* deutlich gesteigerte Tumoraktivität im Vergleich zu Maytansin- oder Auristatin-beladenen Antikörpern. Unklar bleibt jedoch, ob sich die hohe Hydrophobizität des im Nukleophil befindlichen Pentaglycins negativ auf die bereits schlechte Wasserlöslichkeit der zumeist hydrophoben Toxine auswirkt. Dies ist ein kritischer Aspekt für die Skalierbarkeit der Konjugationsreaktion, da für gute Produktausbeuten hohe Überschüsse an Nukleophil eingesetzt werden müssen. Zusätzlich hat die Hydrophilie des Linkers im ADC einen wesentlichen Einfluss auf die *in-vivo*-Effizienz des Wirkstoffkonjugates.^[53] Zudem wurde für die Sortase-katalysierte Reaktion ein unspezifischer Acyltransfer auf aliphatische Amine, wie beispielsweise Lysinseitenketten, beobachtet, was unter Umständen bei der Generierung von ADCs als unerwünschte Nebenreaktion auftreten könnte.^[100,101]

Formylglycin-generierendes Enzym

Das Formylglycin-generierende Enzym (FGE) ist eine Kupfer-abhängige Oxygenase, welche sowohl in Prokaryoten als auch Eukaryoten gefunden wird.^[102] Das erstmals im Jahre 2003

identifizierte Enzym katalysiert die Aktivierung von Sulfatasen durch Umwandlung eines im aktiven Zentrum befindlichen Cysteins zu $C\alpha$ -Formylglycin (fGly).^[103] Hierbei bindet FGE an die Konsensus-Erkennungssequenz CXPXR (X steht für alle beliebigen Aminosäuren, außer Prolin) und oxidiert die Thiolgruppe der Cysteinseitenkette zu einer Aldehydgruppe.

CARRICO *et al.* konnten erstmalig zeigen, dass es möglich ist, eine Aldehydgruppe mittels FGE in rekombinante Proteine einzuführen und nachfolgend für eine ortsspezifische Modifikation einzusetzen.^[104] Exemplarisch ausgewählte Proteine wurden am *N*- oder *C*-Terminus mit der Hexapeptidsequenz LCTPSR ausgestattet, die als „Aldehyd-tag“ bezeichnet wird. Durch die Co-Expression eines prokaryotischen FGE aus *Mycobacterium tuberculosis* während der rekombinanten Herstellung der Zielproteine in *E. coli* konnte das Cystein im Aldehyd-tag mit einer hohen Ausbeute zu fGly konvertiert werden. Nachfolgend konnte die Aldehydgruppe aller rekombinanten Proteine durch Aminoxy- oder Hydrazid-derivatisierte Funktionalitäten (z. B. Alexa Fluor 647, Biotin oder Polyethylenglykol) sowohl ortsspezifisch als auch bioorthogonal modifiziert werden. In Folgestudien konnte der Aldehyd-tag zu der Sequenz CXPXR erweitert werden.^[105]

Ebenso konnte die Co-Expression von FGE für eukaryotische Expressionssysteme etabliert werden, sodass auch komplexere Proteine mit posttranslationalen Modifikationen, wie beispielsweise Antikörper des Typs IgG1, mit fGly ausgestattet werden können.^[106,107]

Die Firma Catalent (ehemals Redwood Bioscience) nutzt FGE im Rahmen ihrer SMARTag™-Technologie Plattform zur Herstellung homogener ADCs (Abb. 3B). Um bei der Generierung von ADCs eine möglichst effiziente Konjugation ausgewählter Wirkstoffmoleküle über die eingeführte Aldehydgruppe zu ermöglichen, wurden diverse Ligationsstrategien entwickelt. Dies sind die Hydrazino-iso-Pictet-Spengler (HIPS)-Ligation,^[108] die *trapped*-Knoevenagel-Ligation^[109] sowie die *tandem*-Knoevenagel-Kondensation-Michael-Addition-Ligation,^[110] welche in Kombination mit der SMARTag™-Technologie zum Einsatz kommen. Letztere ermöglicht die Herstellung von DAR4 ADCs. Hierdurch sollten unter anderem die Nachteile der klassischen Oxim-Ligation mit Aminoxy-derivatisierten Funktionalitäten (lange Reaktionszeit sowie saurer pH-Wert), welche häufig bei der Konjugation an Aldehyd- oder Ketofunktionen zum Einsatz kommt, umgangen werden.^[111]

DRAKE *et al.* testeten die Insertion des Aldehyd-tags an verschiedenen Positionen innerhalb der konstanten Regionen von leichter und schwerer Kette des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab hinsichtlich struktureller Integrität sowie fGly-Konvertierung.^[112] Während Insertionen in der CH2- und CH3-Domäne der schweren Kette zur Aggregation des Antikörpers

fürten, wurden Insertionen in der leichten Kette sowie in der CH1-Domäne und am C-Terminus der schweren Kette gut toleriert. Auch die Konvertierungsrate zum fGly variierte je nach Position des Aldehyd-tags zwischen 86-98 %. Für die nachfolgende Konjugation eines Maytansin-Derivates via HIPS-Ligation konnten Ausbeuten von 75 % an der leichten Kette (LC-ADC) bis über 90 % in der CH1-Domäne (CH1-ADC) sowie am C-Terminus (CT-ADC) erzielt werden. Als Nachteil erscheint hierbei die lange Reaktionszeit von 72 Stunden. Nicht konjugierter Antikörper wurde durch einen finalen Reinigungsschritt mittels hydrophober Interaktionschromatographie abgetrennt.^[112]

Die *in-vivo*-Testung der homogenen ADCs erfolgte im direkten Vergleich zu dem konventionel via Lysinseitenketten konjugierten Kadcylo[®]. Trotz geringerer Toxinbelastung zeigten vor allem das CT-ADC mit konjugiertem Maytansin am C-Terminus der schweren Kette eine deutlich erhöhte Effizienz im Xenograft Tumormausmodell im Vergleich zu Kadcylo[®]. Auch bei den Studien zu Pharmakokinetik sowie zur MTD zeigte das CT-ADC eine deutlich verbesserte Effizienz.^[112]

Transglutaminase

Bei Transglutaminasen, auch Protein-Glutamin- γ -Glutamyltransferasen genannt, handelt es sich um eine Familie von Enzymen, die natürlicherweise die posttranslationale Bildung einer Isopeptidbindung katalysieren, wodurch sie unter anderem zur intra- und intermolekularen Quervernetzung von Proteinen beitragen.^[113] Dies erfolgt über eine Transamidierungsreaktion, wobei die γ -Carbamoylgruppe einer Glutaminseitenkette als Acyldonor und primäre Amine, wie die ϵ -Aminogruppe einer Lysinseitenkette, als Acylakzeptor fungieren. In Abwesenheit einer primären Aminogruppe fungiert ein Wassermolekül als Acylakzeptor, wodurch es zur hydrolytischen Desaminierung von Glutamin zu Glutaminsäure kommt.^[114] Im Gegensatz zu mammalischen Transglutaminasen katalysieren bakterielle Enzyme, wie die mikrobielle Transglutaminase aus *Streptomyces mobaraensis* (mTG), Acyltransferreaktionen in Abwesenheit von Calciumionen und Guanosintriphosphat, was sie zu nützlichen Biokatalysatoren für die Lebensmittelindustrie und Biotechnologie macht.^[115] Auch für die Generierung von homogenen Antikörper-Toxin-Konjugaten mit definiertem DAR konnte Transglutaminase eingesetzt werden. So konnten JEGER *et al.* zeigen, dass native IgG1-Antikörper trotz mehrerer Glutamine nicht durch mTG modifiziert werden können.^[116] Grund hierfür ist eine sterische Limitation seitens Transglutaminase, welche lediglich Glutamine in flexiblen und lösungsmittelzugänglichen Regionen eines Proteins als Substrat akzeptiert.^[117] Wird jedoch die Glykankette des Antikörpers, welche durch eine *N*-glykosidische Bindung an die Seiten-

kette von Asparagin 297 (N297) geknüpft ist, durch eine Glykosidase entfernt, lässt sich die Seitenkette des Glutamins an Position 295 (Q295) mit verschiedensten Cadaverinderivaten spezifisch modifizieren (Abb. 3C).^[116] Auch der Aminosäureaustausch N297Q führt zu einem deglykosylierten Antikörper, welcher zusätzlich in Position 297 durch mTG modifiziert werden kann, wodurch vier Modifikationsstellen je Antikörper zur Verfügung gestellt werden können.^[118] Darauf basierend statteten LHOSPICE *et al.* den CD30-spezifischen Antikörper cAc10 (Brentuximab) mit der Mutation N297Q aus.^[119] Dieser wurde anschließend mit einem Aminocaproyl-derivatisierten MMAE (Aminocaproyl-vc-PABC-MMEA) modifiziert. Hierfür wurden 80 molare Äquivalente der Toxinkomponente je Antikörper eingesetzt. Zudem war eine lange Reaktionszeit von 16 Stunden notwendig. Nach Reinigung zeigte der ADC einen DAR von 3,7. Auch konnte eine chemoenzymatische Zweischnittmodifizierung gezeigt werden. So wurde cAC10-N297Q im ersten Schritt mit einer Azid-beladenen Aminokomponente modifiziert. Im zweiten Schritt wurde die Toxinkomponente via DBCO-Linker durch eine Kupfer-freie SPAAC-Klick-reaktion kovalent angefügt, wobei der resultierende ADC nach Reinigung einen DAR von 4,0 besaß. Jedoch zeigte dieser chemoenzymatisch hergestellte ADC eine hohe Instabilität in Mausplasma, sodass lediglich der rein enzymatisch hergestellte ADC *in vivo* getestet wurde. Es erfolgte ein direkter Vergleich mit dem zugelassenen ADC Adcetris[®], wobei der mittels mTG modifizierte ADC vergleichbare Effizienzen im Tumormausmodell sowie verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften zeigte, woraus ein gesteigertes therapeutisches Fenster resultiert.^[119]

Eine alternative Strategie zur mTG-katalysierten ADC-Herstellung liegt in der Verwendung eines mTG-spezifischen Glutamin-*tags* (LLQGA), welcher durch STROP *et al.* erstellt und auf Antikörper übertragen wurde (Abb. 3D).^[120] Hierzu wurde der *tag* zunächst an 90 verschiedenen Positionen eines anti-EGFR-IgG1-Antikörpers eingefügt, um Positionen zu identifizieren, welche eine hohe Konjugationseffizienz ermöglichen ohne dabei die Funktionalität des Antikörpers zu beeinträchtigen. Von insgesamt zwölf identifizierten Positionen wurden zwei (jeweils der C-Terminus der schweren und leichten Kette) in Folgestudien *in vitro* und *in vivo* charakterisiert. Auf Basis eines Anti-M1S1-Antikörpers mit einem Glutamin-*tag* am C-Terminus der schweren oder leichten Kette wurden mTG-katalysiert ADCs hergestellt, wobei ein MMAD-beladenes Lysinderivat mit proteasespaltbarem Linker (Ac-Lys-vc-PABC-MMAD) als Nukleophil diente. Wie bei der Modifizierung der endogenen Glutamine (Q295 und N297Q) war eine lange Reaktionszeit von 16 Stunden nötig. Nach Reinigung konnten ADCs mit einem DAR von 1,8 bis 1,9 erhalten werden. Die ortsspezifisch modifizierten ADCs wurden hinsichtlich ihrer *in-vivo*-Effizienz mit einem konventionell modifizierten

ADC verglichen, wobei ähnliche Antitumoraktivitäten verzeichnet werden konnten. Zudem konnte gezeigt werden, dass die ortsspezifische Konjugation des Toxins zu einer gesteigerten MTD führt, wodurch sich ein gesteigertes therapeutisches Fenster ergibt. Eine unspezifische Modifizierung des endogenen Q295 kann durch die Mutation Q295N unterbunden werden.^[115]

Glykan-remodeling

Eine weitere Möglichkeit zur Generierung ortsspezifisch modifizierter ADCs bietet die chemoenzymatische Modifikation von Zuckerresten der Glykankette eines Antikörpers, welche über eine *N*-glykosidische Bindung mit der Seitenkette von Asparagin 297 (N297) geknüpft ist. Beispielsweise verwendeten ZHOU *et al.* die beiden Glycosyltransferasen β -1,4-Galaktosyltransferase (GalT) und α -2,6-Sialyltransferase (SialT), um eine Sialinsäure an die endständige Galactose der Glykankette von Trastuzumab zu knüpfen.^[121] In einem zweiten Schritt wurde die Sialinsäure mittels Natriumperodat oxidiert, sodass eine reaktive Aldehydgruppe für eine nachfolgende Oxim-Ligation zur Verfügung stand. Dies erfolgte mit Aminoxy-derivatisiertem MMAE oder Dolastin10, wobei nach Reinigung ADCs mit einem DAR von 1,6 erhalten wurden. Die Antitumoraktivitäten der ortsspezifisch modifizierten ADCs wurden mit einem konventionell modifizierten ADC verglichen. So zeigten alle ADCs eine vergleichbare *in-vitro*-Zytotoxizität. Im Xenograft-Tumormausmodell zeigte der konventionell modifizierte ADC jedoch eine höhere Effizienz als die ortsspezifisch modifizierten ADCs. Ein Grund hierfür könnte die höhere Toxinbeladung des konventionellen ADC mit einem DAR von 3,8 sein.^[121]

Eine weitere Methode, etabliert von van GEEL *et al.*, basiert auf der Restrukturierung der Glykankette von Antikörpern, wodurch eine bioorthogonale Funktionalität für eine nachfolgende Modifizierungsreaktion eingeführt wurde (Abb. 3E).^[122] Auf Basis von Trastuzumab wurden zunächst alle Zuckerfunktionalitäten, außer das am Asparagin 297 gebundene *N*-Acetylglucosamin (GlcNac), durch eine Endoglycosidase (Endo S) abgespalten. In einem zweiten Schritt erfolgte die Knüpfung eines Azido-modifizierten *N*-Acetylgalactosamin (GalNaz) an GlcNac, was durch eine spezielle Galactosyltransferase (GalT-Y289L) katalysiert wurde. Über die hierdurch eingeführte Azidogruppe konnte die Toxinkomponente (Maytansin, MMAF oder Duocarmycon SA) mittels Bicyclononin (BCN)-Linker durch eine Kupfer-freie SPAAC-Klickreaktion kovalent angefügt werden. Nach Reinigung wurden ADCs mit einem DAR von 2 erhalten. Als nachteilig erweisen sich die zahlreichen Prozessschritte sowie eine lange Inkubationszeit von mehr als 48 Stunden bei 30 °C oder höher. Die

erhaltenen ADCs wurden schließlich *in vitro* und *in vivo* getestet. Insbesondere *in vivo* zeigte das Maytansin- sowie MMAF-derivatisierte Trastuzumab im Vergleich zum konventionellen Kadcyła[®] eine ausgeprägtere Tumorregression trotz geringerer Toxinbelastung. Zudem konnte eine universelle Anwendung der als ClycoConnect bezeichneten Technologie durch die Modifizierung unterschiedlicher IgG Isotypen (IgG1, IgG2 und IgG4) demonstriert werden.^[122,123]

Allen hier vorgestellten chemischen sowie enzymatischen Konjugationsstrategien gemein ist die Generierung homogener sowie ortsspezifisch modifizierter Wirkstoff-Konjugate, wodurch zumeist die *in-vivo*-Effizienz, die Pharmakokinetik oder auch das klinische Sicherheitsprofil entsprechend konventionell hergestellter ADCs verbessert werden konnte. Demgegenüber stehen jedoch oftmals prozessrelevante Herausforderungen, wie beispielsweise komplexe Linkersynthesen, der notwendige Zusatz von Reduktionsmitteln oder organischen Lösungsmitteln, lange Inkubationszeiten, zahlreiche Produktions- und Reinigungsschritte, die Notwendigkeit für spezielle Expressionssysteme oder auch die fehlende Skalierbarkeit des Herstellungsprozesses. Neben der Weiterentwicklung und Optimierung genannter Konjugationsstrategien besteht daher ein großes Interesse an der Entwicklung und Etablierung alternativer Strategien. Dies zeigt sich anhand einer Vielzahl von Konjugationsmethoden, welche im Kontext der ortsspezifischen Antikörpermodifikation erfolgreich eingesetzt wurden oder das Potential hierzu besitzen. Auf Seiten der chemischen Methoden wären beispielsweise die π -clamp-vermittelte Cysteinkonjugation,^[124] die Intein-vermittelte Konjugation via *expressed protein ligation* (EPL) oder Protein-*trans*-Spleißen,^[125] die Konjugation via polyionischer Fusionspeptide^[126] oder auch der Einsatz von *coiled-coil* Peptiden^[127,128] zu nennen. Beispiele für enzymatische Konjugationsmethoden wären die Trypsiligase,^[129–131] die Biotinligase,^[132] die Liponsäure-Ligase,^[133] die SpyLigase,^[134] AnkX,^[135] die Butelase I,^[136] die Phosphopantethein-Transferase^[137] sowie die Tubulin-Tyrosin-Ligase^[138,139]. Vor allem bei Trypsiligase handelt es sich um eine vielversprechende Trypsinvariante zur Generierung homogener Wirkstoffkonjugate. Diese wird im nachfolgenden Kapitel näher vorgestellt.

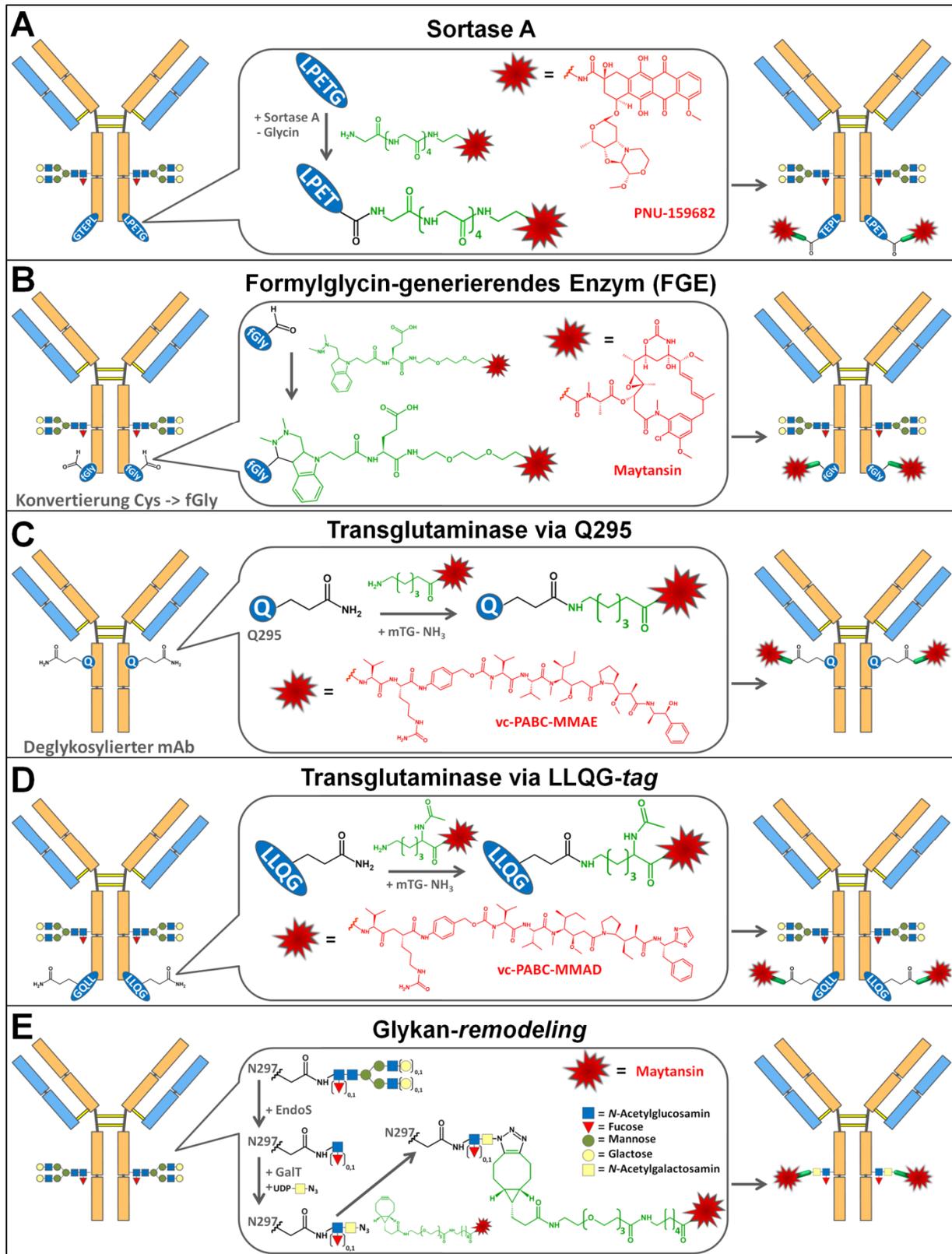


Abbildung 3: Schematische Übersicht zu enzymatischen Konjugationsmethoden. A) Darstellung der Sortase A-katalysierten Modifikation via Transpeptidierung.^[140] B) Darstellung zur Modifikation des FGE-generierten α -Formylglycin (fGly) mittels Hydrazino-iso-Pictet-Spengler (HIPS) Ligation.^[112] C) Modifikation des nativen Glutamin 295 (Q295) eines zuvor deglykosylierten Antikörpers mittels mikrobieller Transglutaminase (mTG).^[141] D) Transglutaminase-katalysierte Modifikation eines Antikörpers anhand eines mTG-spezifischen Glutamin-tags (LLQG).^[142] E) Chemoenzymatische Modifikation der Glykankette eines Antikörpers durch remodeling mittels Endoglycosidase S (EndoS) und Galactosyltransferase (GalT).^[122]

1.3 Trypsinase

Bereits im Jahre 1898 postulierte van't HOFF bei Betrachtungen zum chemischen Gleichgewicht die Möglichkeit, Proteasen aufgrund der mikroskopischen Reversibilität enzymatischer Reaktionen zur Knüpfung von Peptidbindungen einzusetzen. Experimentell konnte diese Theorie erstmals 1938 durch BERGMAN und FRAENKEL-CONTRAT am Beispiel des Papains gezeigt werden.^[143] Clostripain, die V8-Protease sowie Thermolysin sind weitere Beispiele für Proteasen, die im Kontext der Knüpfung einer Peptidbindung durch reverse Hydrolyse eingesetzt werden konnten. Da die Gleichgewichtskonstante der Bildung einer Peptidbindung unter physiologischen Bedingungen mit 10^{-3} - 10^{-4} L/mol jedoch weit auf Seiten des Hydrolyseproduktes liegt, bedarf es jedoch einer Manipulation der Reaktionsbedingungen, um das Gleichgewicht der Reaktion zu Gunsten der Peptidbindungsbildung zu verschieben.^[144,145] In der Literatur werden hierfür zwei Protease-katalysierte Synthesestrategien beschrieben, die gleichgewichtskontrollierte Peptidsynthese und die kinetisch kontrollierte Peptidsynthese. Die gleichgewichtsbasierte Strategie basiert auf der direkten Umkehrung der Protease-katalysierten Hydrolyse von Peptidbindungen und ermöglicht den Einsatz aller Proteasen unabhängig von deren Katalysemechanismus. Als nachteilig erweist sich die geringe Produktausbeute in Kombination mit einer geringen Synthesegeschwindigkeit sowie dem Bedarf von oftmals hohen Konzentrationen organischer Lösungsmittel.^[146]

Die kinetisch kontrollierte Protease-katalysierte Synthesestrategie ist auf Proteasen limitiert, welche in der Lage sind, ein kovalentes Acyl-Enzym-Intermediat auszubilden. Dies sind Serin- und Cysteinproteasen. Gemäß der von SCHECHTER und BERGER eingeführten Nomenklatur zur Substratspezifität von Proteasen werden für die Peptidsynthese schwach aktivierte Esterderivate von Aminosäuren oder Peptiden mit passender P1-Spezifität eingesetzt, welche eine schnelle Bildung des Acyl-Enzym-Intermediates bedingen.^[147] Als Acylakzeptor in dem sich anschließenden Deacylierungsschritt kann sowohl Wasser, als auch die α -Aminogruppe einer Aminosäure oder eines Peptides dienen. Letztere bedingt die Bildung einer neuen Peptidbindung und wird als Aminolyse bezeichnet. Da das Aminolyseprodukt im Vergleich zum Aminosäureester das schlechtere Substrat darstellt, kommt es zu einer temporären Produktakkumulation, welche deutlich über der thermodynamisch determinierten Gleichgewichtskonzentration liegt.^[148]

Limitierende Faktoren hinsichtlich der Syntheseeffizienz sind (i) das Verhältnis der Geschwindigkeiten von Aminolyse zu Hydrolysereaktion bei der Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediates und (ii) die Primärspezifität der Protease, welche eine Sekundärhydrolyse des

Aminolyseproduktes nach Verbrauch des Estersubstrates bedingt, da auch im Aminolyseprodukt selbst die Erkennungssequenz der Protease vorhanden ist.

Die Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediates durch Wasser lässt sich prinzipiell durch Medium-Engineering minimieren, hat jedoch oftmals zur Folge, dass harsche sowie nicht physiologische Reaktionsbedingungen notwendig sind, welche die Stabilität und Aktivität des Katalysators sowie der Zielstruktur beeinflussen können.^[145] Die Sekundärhydrolyse des Aminolyseproduktes lässt sich durch ein Substrat-Engineering vermeiden. Als äußerst effizient erwies sich in diesem Kontext das Substratmimetika-Konzept, bei dem die S1-Spezifität der Protease in die Esterabgangsgruppe verlagert wird.^[149] Hierbei erfolgt die der Acylierung vorgelagerte Einbindung des Substrates in den S1-Bindungsort nicht über die in P1-Position befindliche Aminosäure, sondern über die angepasste Esterabgangsgruppe. Ein für Trypsin und Chymotrypsin geeignetes Substratmimetikum stellt der 4-Guanidinophenylester dar, welcher die Spezifität für basische respektive aromatische Aminosäuren durch die Guanidino- sowie Phenylfunktion bedient.^[150,151] Befindet sich in der P1-Position des Substratmimetikums eine für die Protease unspezifische Aminosäure, führt dies zu einem Aminolyseprodukt, welches aufgrund fehlender Erkennungssequenz im Bereich der Ligationsstelle inert gegenüber einer Sekundärhydrolyse ist. Jedoch steigt mit zunehmender Länge des Acylakzeptors die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens von Aminosäuresequenzen, die der Spezifität der eingesetzten Protease entsprechen, sodass es auch hier zur unerwünschten Hydrolyse des Ligationsproduktes kommen kann.^[145] Um auch komplexere Zielstrukturen wie beispielsweise Proteine modifizieren zu können, bedarf es letztlich einer Anpassung des Biokatalysators hinsichtlich Substratspezifität sowie Selektivität durch gezieltes Enzym-Engineering.

Im Rahmen eines rationalen Enzym-Engineering konnte aus der Serinprotease Trypsin im Arbeitskreis BORDUSA ein neuartiger Biokatalysator entwickelt werden, welcher bei einer Reaktionsführung im wässrigen System eine *N*- sowie *C*-terminale Modifizierung von Proteinen ermöglicht.

Grundlage hierfür waren umfangreiche Studien basierend auf dem anionischen Rattentrypsin II, von dem über 60 rational designte Enzymvarianten hinsichtlich ihrer Eignung als Peptidligase für Substratmimetika-basierte Synthesereaktionen untersucht wurden.^[152] Die Enzymvariante mit den Mutationen D189K sowie K60E zeigte die höchste Syntheseeffizienz mit Substratmimetika des 4-Guanidinophenylester-Typs. Grund dafür ist ein deutlich verbessertes Verhältnis von Esterase- zu Amidaseaktivität im Vergleich zum Wildtypenzym. Die Mutation D189K führte zu einer deutlich verminderten Amidaseaktivität gegenüber Trypsin-

spezifischen Peptidsubstraten mit basischen Aminosäureseitenketten in P1-Position, wohingegen die Esteraseaktivität gegenüber Substraten mit aromatischen Aminosäureseitenketten in P1-Position gesteigert wurde. Zudem konnte in Acyltransferexperimenten eine deutlich gesteigerte Präferenz für Acylakzeptoren mit Arginin oder Lysin in P1'-Position verzeichnet werden. Dies korreliert mit den Ergebnissen von KURTH *et al.*, welche für die Trypsinvariante K60E in Acyltransferexperimenten eine um zwei Größenordnungen gesteigerte Aktivität gegenüber Substraten mit P1'-Arginin zeigen konnten.^[153] Unter Verwendung des Substratmimetika-Konzeptes gelang es mit der Doppelmutante K60E/D189K verschiedenste Acylreste auf peptidische Acylakzeptoren zu übertragen. Zudem konnte am Beispiel der Ribonuklease A erstmalig eine Substratmimetika-basierte *N*-terminale Modifikation eines Proteins gezeigt werden, wobei die enzymatische Aktivität des Zielproteins vollständig erhalten blieb.^[152] Jedoch ergab sich für die Modifizierung eine limitierte Produktausbeute von 8,7 %.

Zur weiteren Optimierung dieser Peptidligase konnte Frau S. LIEBSCHER (AG BORDUSA, MLU Halle-Wittenberg) im Rahmen ihrer Dissertation die Doppelmutante K60E/D189K um eine S2'-Spezifität für Histidin erweitern.^[154] Dies wurde durch den Austausch der Aminosäuren Asparagin 143 (N143) sowie Glutamat 151 (E151) durch zwei Histidine ermöglicht, wodurch eine artifizielle Bindestelle für zweiwertige Metallionen eingeführt werden konnte. Die durch WILLET *et al.* beschriebene Trypsinvariante N143H/E151H/D189S zeigt beispielsweise eine um den Faktor 350 gesteigerte Hydrolyseaktivität gegenüber Peptidsubstraten mit P2'-Histidin in Gegenwart von Zinkionen.^[155,156] Maßgeblich hierfür ist die Komplexierung der drei Imidazolringe von N143H, E151H sowie P2'-Histidin durch das Zinkion als Zentralatom. Die Trypsinvariante K60E/N143H/E151H/D189K, welche als Trypsiligase bezeichnet wird, zeigt eine hohe Spezifität gegenüber der Erkennungssequenz YRH, wobei sie in Gegenwart zweiwertiger Metallionen die Peptidbindung zwischen Tyrosin und Arginin proteolytisch spaltet (Abb. 3A).

Unter Verwendung des Substratmimetika-Konzeptes zeigte Trypsiligase eine hervorragende Synthese-eigenschaft, wodurch es gelang, eine universell einsetzbare Synthesestrategie für die *N*-terminale Modifizierung von Polypeptiden und Proteinen zu etablieren.^[154] Dies konnte exemplarisch für eine Reihe von Proteinen unterschiedlicher Größe und Sekundärstruktur gezeigt werden, welche zuvor am *N*-Terminus mit der Erkennungssequenz YRH ausgestattet wurden (Abb. 3B). So konnten beispielsweise humanes EGF, humanes Cyclophilin 18, Parvulin 10 aus *E. coli* sowie humanes Pin1 mit verschiedenen 4-Guanidinophenylester-Derivaten modifiziert werden. Die eingeführten Funktionalitäten umfassten hierbei diverse

Farbstoffe (z.B.: Carboxyfluorescein, Alexa Fluor 488 oder TAMRA), das Polymer PEG2000 sowie Biotin.^[129] Da die entstandenen Modifizierungsprodukte nicht mehr die *N*-terminale Erkennungssequenz YRH besitzen, kommt es zu keiner Sekundärhydrolyse durch den Biokatalysator. Folglich führte die Trypsiligase-katalysierte *N*-terminale Modifikation aller Proteine zu quantitativen Produktausbeuten. Bei keinem der modifizierten Proteine wurden weder unerwünschte Spaltprodukte nach intrinsischen basischen Aminosäuren gefunden, wie es für Wildtyp-Trypsin der Fall gewesen wäre, noch anderweitige Spaltprodukte. Ursächlich hierfür ist der Austausch von Aspartat 189 gegen Lysin, welches sich im nativen Enzym am Boden der S1-Bindetasche befindet und über eine Salzbrücke die präferenzielle Einbindung von Arginin oder Lysin bedingt.^[157,158]

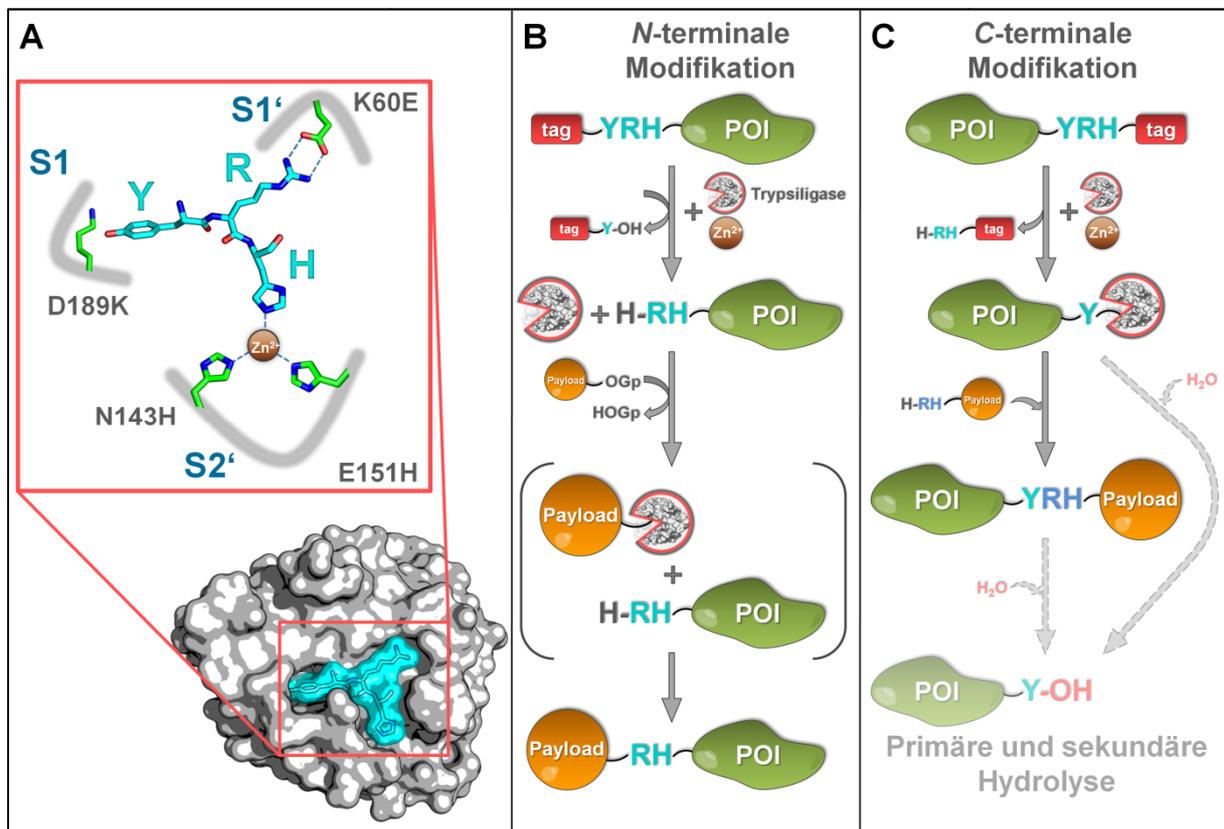


Abbildung 4: Schematische Darstellung zum rationalen Enzym-Engineering sowie zur *N*- und *C*-terminalen Modifikation von Proteinen mittels Trypsiligase. **(A)** Die Einführung der vier Mutationen K60E/N143H/E151H/D189K in das anionische Rattentrypsin II führt zur Generierung von Trypsiligase (PDB: 4NIY). Diese Peptidligase besitzt in Gegenwart von zweiwertigen Metallionen eine hohe Spezifität gegenüber der Erkennungssequenz YRH. **(B)** Trypsiligase katalysiert im Rahmen einer Acyltransferreaktion die *N*-terminale Modifikation von Proteinen, welche zuvor mit einem RH-Motiv am *N*-Terminus ausgestattet wurden. Die Modifizierung erfolgt im Kontext des Substratmimetika-Konzeptes, wobei Substratmimetika des 4-Guanidinophenylester-Typs verwendet werden. Die Modifizierung erfolgt quantitativ, weil im gewünschten Produkt die Erkennungssequenz YRH nicht rekonstituiert wurde. **(C)** Die *C*-terminale Modifikation verläuft über eine Transamidierungsreaktion, wobei das Zielprotein anhand der *C*-terminal eingeführten Erkennungssequenz als Acyldonor fungiert. Der Acylrest des Acyl-Enzym-Intermediates wird auf ein extern hinzu gegebenes Peptid oder Protein mit *N*-terminalem RH-Motiv via Aminolyse übertragen. Da im Transamidierungsprodukt die Erkennungssequenz YRH rekonstituiert wird, besteht die Möglichkeit einer Sekundärhydrolyse, welche neben der Primärhydrolyse die Produktausbeute limitiert.

Neben der *N*-terminalen Proteinmodifikation katalysiert Trypsiligase auch die *C*-terminale Modifikation von Proteinen durch eine Transamidierungsreaktion.^[154] Im Gegensatz zur *N*-terminalen Modifikation via Acyltransfer, bei der ein Aktivester als Acyldonor fungiert, agiert bei der Transamidierungsreaktion das Zielprotein als Acyldonor (Abb. 3C). Hierzu wird das Zielprotein am *C*-Terminus mit der Erkennungssequenz YRH ausgestattet. Trypsiligase spaltet die Erkennungssequenz durch einen nukleophilen Angriff des Ser195 der katalytischen Triade auf das Carbonyl-C-Atom der Peptidbindung zwischen Tyrosin und Arginin. In der Folge kommt es zur Ausbildung eines Acyl-Enzym-Intermediates mit der Carbonylfunktion des Tyrosins. Anschließend erfolgt die Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediates durch einen nukleophilen Angriff eines Acylakzeptors, auf welchen schließlich der Acylrest transferiert wird. Trypsiligase favorisiert hierbei im Rahmen einer Aminolysereaktion die α -ständige Aminogruppe eines Peptides oder Proteins mit *N*-terminalem RH-Motiv als Acylakzeptor. Hierbei kann der Acylakzeptor mit unterschiedlichen Funktionalitäten, wie beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffen, Radionuklidchelatoren, Toxinen, Polymeren oder auch Klickankern bestückt sein, was eine vielfältige Funktionalisierung des Zielproteins ermöglicht.^[130,131,154,159] Jedoch ist Trypsiligase auch in der Lage, den Acylrest auf ein Wassermolekül zu übertragen, was wiederum als Hydrolyse bezeichnet wird und den Reaktionsweg von Wildtyptrypsin skizziert.

Es konnte gezeigt werden, dass diese Präferenz für eine Deacylierung mittels Aminolyse auf eine Substrat-aktivierte Katalyse zurück geführt werden kann. So konnte anhand der Kristallstruktur von Trypsiligase gezeigt werden, dass das Konformationsgleichgewicht zwischen Zymogen und aktivem Enzym bei Trypsiligase im Substrat-ungebundenen Zustand in Richtung zymogener Konformation verschoben ist.^[129] Grund hierfür ist eine zymogenähnliche ungeordnete Struktur der Aktivierungsdomäne (diese umfasst die Aminosäuren I16-G19, G142-P152, L185-D194 und S217-N223), welche erst nach Substrateinbindung in eine aktive Konformation übergeht und damit eine Deacylierung insbesondere via Aminolyse ermöglicht. Das Verhältnis der Geschwindigkeiten von Aminolyse- zu Hydrolysereaktion beim Deacylierungsschritt ist hierbei maßgeblich für die Syntheseeffizienz bei der *C*-terminalen Modifizierung via Transamidierung. Für Trypsiligase liegt die Partitionierung der Deacylierungsreaktion vor allem bei Substrat- sowie Nukleophilkonzentrationen im hohen mikromolaren Bereich weit auf Seiten der Aminolyse.

Bei Substratkonzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich - einem Konzentrationsbereich auf den oftmals anspruchsvolle therapeutische Zielproteine wie beispielsweise Antikörper limitiert sind - ändert sich die Partitionierung jedoch zu Gunsten der Hydrolyse, was in

einer deutlich reduzierten Produktausbeute resultiert. Zusätzlich wird die Produktausbeute durch die Rekonstitution der Erkennungssequenz YRH im gewünschten Transamidierungsprodukt limitiert, da das Transamidierungsprodukt erneut als Acyldonor fungieren kann, wodurch eine Sekundärhydrolyse des Produktes durch Trypsiligase ermöglicht wird. Dennoch konnten eine Reihe von Zielproteinen wie humanes EGF, Parvulin 10 aus *E. coli*, ein Her2/neu-spezifisches Fab-Fragment sowie ein TNF α -spezifisches Fab-Fragment C-terminal modifiziert werden.^[131,154] Die Modifikation erfolgte jeweils mit einem Carboxyfluorescein-beladenen Peptidnukleophil (H-RHAK(CF)-OH), wobei die Produktausbeuten für das humane EGF sowie für das Parvulin 10 bei ca. 25 % lagen und für die beiden Fab-Fragmente bei ca. 40 %. Da die Transamidierungsreaktionen bei einem zehnfachen Überschuss an Nukleophil durchgeführt wurden, liegt die theoretisch maximal erreichbare Produktausbeute bei ca. 90 %. Die Diskrepanz zwischen den tatsächlich erzielten Ausbeuten und der theoretisch möglichen Ausbeute resultiert aus den oben beschriebenen Limitationen hinsichtlich der Deacylierung via Hydrolyse als unerwünschter Nebenreaktion.

Aufgrund dieser limitierten Produktausbeute bei der C-terminalen Proteinmodifikation besteht hier weiterer Bedarf zur Optimierung der Trypsiligase hinsichtlich der katalysierten Transamidierungsreaktion.

1.4 Evolutionäre Optimierung von Enzymen

Das rationale Enzym-Engineering, bei dem ein detailliertes Wissen bezüglich Struktur, Funktion und Katalysemechanismus unabdingbar ist, unterliegt Limitationen, welche sich aus einer begrenzten Anzahl gezielt einführbarer Aminosäureaustausche sowie unter Umständen unbekanntem Struktur-Wirkungsbeziehungen ergibt. Dem gegenüber steht das evolutionäre Enzym-Engineering, bei dem es möglich ist, mithilfe eines geeigneten Selektionsverfahrens, wie beispielsweise dem Phagen-Display,^[160] dem Hefe-Display,^[161] dem Ribosomen-Display^[162] oder dem mRNA-Display^[163], Biokatalysatoren innerhalb einer großen Variantenbibliothek anzureichern, welche die gewünschten Katalyseeigenschaften aufweisen. Die eingesetzte Selektionsmethode sollte hierbei zum einen eine Phänotyp-Genotyp-Kopplung ermöglichen und zum anderen sollte sie eine gezielte Selektion von Biokatalysatoren erlauben, wobei als Selektionsmarker die zu katalysierende Reaktion zum Tragen kommt.

Die Generierung von Variantenbibliotheken kann unabhängig von gegebenen Struktur-Wirkungsbeziehungen durch ein statistisches Design erfolgen, wobei zufällige Mutationen auf DNA-Ebene beispielsweise via *error-prone-PCR* oder *DNA-shuffling* eingeführt werden.^[164]

Desweiteren gibt es auch die Möglichkeit, Struktur-Wirkungsbeziehungen auf Basis kombinatorischer Variantenbibliotheken einfließen zu lassen, wobei auf DNA-Ebene zufällige Mutationen innerhalb des Codons einer oder mehrerer gewünschter Aminosäurepositionen eingeführt werden. Eine derartige Optimierung via evolutionärem Enzym-Engineering konnte bereits erfolgreich für verschiedene Enzyme wie beispielsweise Subtiligase,^[165,166] Sortase A^[98,167–170] oder auch Transglutaminase^[171,172] hinsichtlich katalytischer Aktivität sowie Substratspezifität gezeigt werden.

So konnte beispielsweise Subtiligase, welche eine rational designte Peptidligase auf Basis der Serinprotease Subtilisin BPN darstellt (Einführung der Mutationen S221C und P225A^[165]), mittels eines Phagen-Display Verfahrens hinsichtlich seiner katalytischen Effizienz verbessert werden.^[166] Subtiligase katalysiert den Acyltransfer von aktivierten Peptidestern auf die *N*-terminale α -Aminogruppe von Peptiden und Proteinen als Acylakzeptoren, wobei Subtiligase eine hohe Flexibilität hinsichtlich der Aminosäuren in P1'- und P2'-Position seitens des Acylakzeptors aufweist.^[165] Für die evolutionäre Optimierung wurden insgesamt 25 Aminosäurepositionen in räumlicher Nähe zur katalytischen Triade randomisiert, wobei diese auf sechs DNA-Bibliotheken verteilt wurden. Die Selektion mittels Phagen-Display erfolgte über eine intramolekulare Produktimmobilisierung. Dazu wurden die auf M13-Phagen präsentierten Subtiligasevarianten (als Fusionsprotein mit *C*-terminal angefügtem Phagenhüllprotein pIII) an deren *N*-Terminus um eine kurze Aminosäuresequenz verlängert, welche durch Subtiligase im Rahmen der Acyltransferreaktion als Acylakzeptor eingebunden wird. Eine Inkubation von Subtiligase-präsentierenden Phagen mit einem Biotin-tragenden Peptidester als Acyldonor führt zur intramolekularen Ligation des Biotins an den verlängerten *N*-Terminus von Subtiligase. Anschließend können diese biotinylierten Subtiligase-Phagen auf einer Neutravidin-beschichteten Mikrotiterplatte immobilisiert und nicht biotinylierte inaktive Subtiligase-Phagen über Waschschrte entfernt werden. Durch eine Selektion über 5-7 Selektionsrunden konnten innerhalb der sechs Variantenbibliotheken Subtiligasevarianten angereichert werden, welche eine bis zu Faktor 2,7 gesteigerte katalytische Aktivität im Vergleich zur nativen Subtiligase zeigten.^[166]

Diese Strategie der Selektion mittels Phagen-Display via intramolekular katalysierter Produktimmobilisierung konnte ebenfalls von Piotukh *et al.* erfolgreich für die Transpeptidase Sortase A (vgl. 1.2.2, S. 12) eingesetzt werden.^[169] Der Fokus des evolutionären Engineerings lag auf der Änderung der Substratspezifität von Sortase A von der ursprünglichen Erkennungssequenz LPXTG hin zu FPXTG und APXTG (X steht für jede beliebige Aminosäure). Hierbei wurden in einer ersten Variantenbibliothek basierend auf Sortase A sechs Aminosäurepositio-

nen des $\beta 6/\beta 7$ -Loops randomisiert. Die auf M13-Phagen präsentierten Sortasevarianten wurden mit einem *N*-terminalen Pentaglycin-Motiv ausgestattet, um hierüber eine intramolekulare Produktimmobilisierung via Transpeptidierung zu ermöglichen. Eine Selektion mittels Phagen-Display ermöglichte die Anreicherung von Sortasevarianten mit erhöhter Aktivität gegenüber den Erkennungssequenzen APXTG sowie FPXTG. Die hieraus resultierende Sortasevariante F40 mit Präferenz für APXTG konnte erfolgreich für die Semisynthese und Modifikation des Histons H3 eingesetzt werden, welches natürlicherweise über ein APATG-Motiv verfügt.^[173] In einer weiterführenden Arbeit von SCHMOHL *et al.* konnten noch effizientere Sortase A-Varianten mit Präferenz für die Erkennungssequenzen FPXTG und APXTG generiert werden.^[168] Dies erfolgte anhand einer Variantenbibliothek zweiter Generation, bei der 9-11 Aminosäurepositionen des $\beta 6/\beta 7$ -Loops randomisiert wurden.

Das Phagen-Display konnte ebenfalls im Arbeitskreis BORDUSA als ein Selektionsverfahren zur gezielten Optimierung von Trypsiligase im Rahmen der Dissertation von Frau S. GISSEL etabliert werden.^[159] Hierbei konnte zunächst gezeigt werden, dass es möglich ist, Trypsiligase als Fusionsprotein mit der *C*-terminalen Domäne des Phagenhüllproteins pIII aktiv auf der Oberfläche des Bakteriophagen M13 zu präsentieren, wobei die genetische Information für Trypsiligase Phagemid-lokalisiert im Inneren des Phagen verpackt ist (Abb. 4A). Wie in Abbildung 4B gezeigt, erfolgt die Anreicherung von Trypsiligase-Varianten mit verbessertem Aminolyse- zu Hydrolyseverhältnis bei dem etablierten Selektionsverfahren über die Fähigkeit zur Ausbildung eines stabilen Acyl-Enzym-Intermediates in wässriger Lösung sowie dessen effizienter Aminolyse in Anwesenheit eines peptidischen Nukleophils. Realisiert wurde dies durch Verwendung eines *N*-terminal biotinylierten Peptidsubstrates, welches auf einer Streptavidin-beschichteten Oberfläche immobilisiert werden kann und über die Erkennungssequenz YRH verfügt. Eine Inkubation des Peptidsubstrates mit Trypsiligase-Varianten, welche monovalent auf der Oberfläche von M13-Phagen präsentiert werden, führt zur Ausbildung von Acyl-Enzym-Phagen-Intermediaten. Über einen nachfolgenden Waschschrift können Trypsilasevarianten mit hoher Hydrolyseaktivität entfernt werden. Anschließend erfolgt die Elution verbliebener Acyl-Enzym-Phagen-Intermediate über eine Aminolysereaktion, was durch Zugabe eines Nukleophils mit *N*-terminalem RH-Motiv realisiert wurde.

Die Funktionalität des etablierten Selektionsverfahrens wurde schließlich anhand einer kombinatorischen Trypsiligasebibliothek getestet, bei der fünf Aminosäurepositionen (S61, R62, Q64, S190 und Q192) im Bereich des aktiven Zentrums randomisiert wurden. Bei der anschließenden Selektion mittels Phagen-Display zeigten sich Limitationen hinsichtlich der Anzahl durchführbarer Selektionsrunden, was in der Anreicherung sogenannter *escape*-

Mutanten begründet war. Diese *escape*-Mutanten stellen auf Proteinebene nicht funktionale Enzymvarianten dar, welche über Genmutationen verfügen, die während der Proteinbiosynthese zu fehlerhaften Translationsprodukten führen.

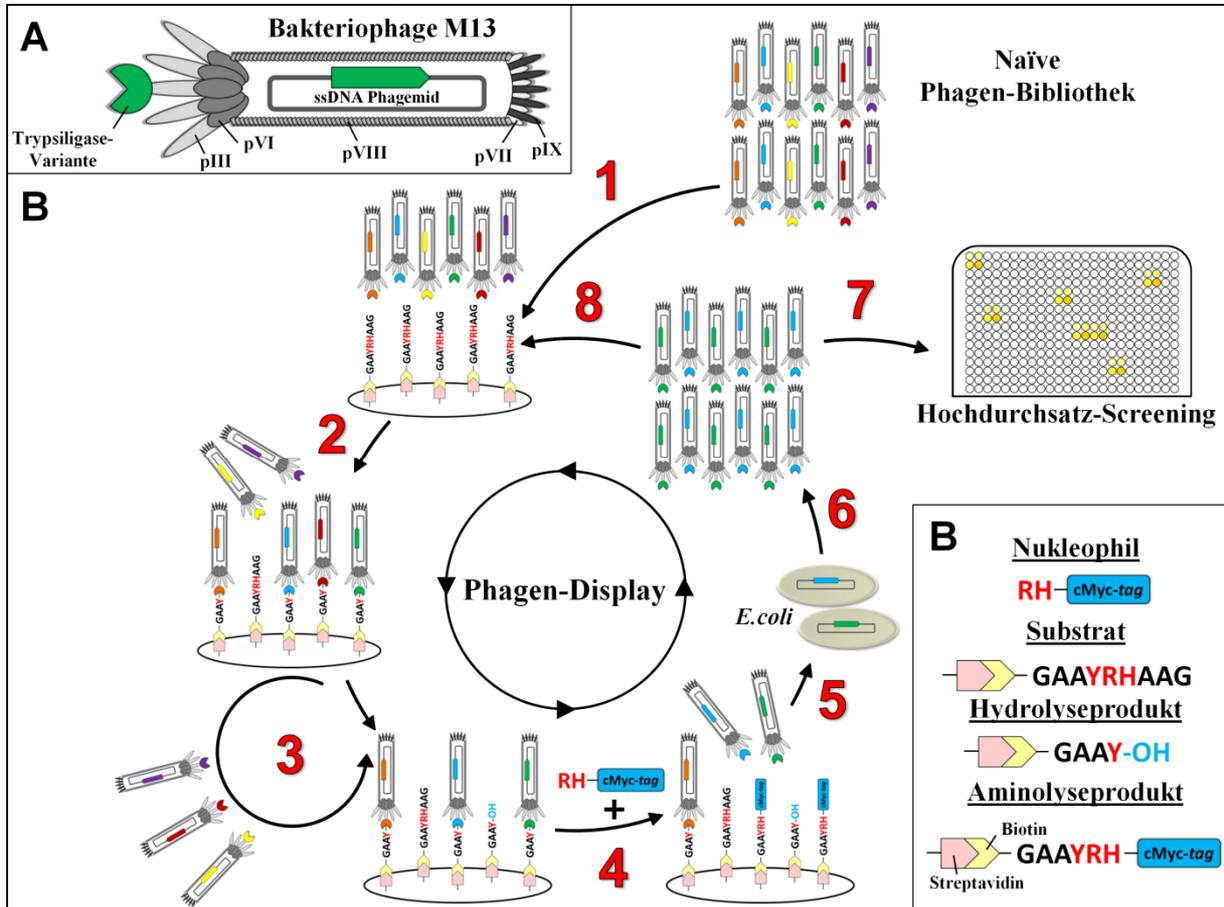


Abbildung 5: Schematische Darstellung der evolutionären Selektion verbesserter Biokatalysatoren mittels Phagen-Display. **A)** Prinzip der Phänotyp-Genotyp-Kopplung beim Phagen-Display: Eine einzigartige Trypsinvariante wird durch eine C-terminale Fusion mit dem Phagenhüllprotein pIII monovalent auf der Oberfläche des filamentösen Phagen M13 präsentiert. Die genetische Information ist auf einem Phagemid lokalisiert, welches im Inneren des M13-Phagen verpackt ist. **B)** Eine Anreicherung von verbesserten Trypsinvarianten erfolgt über die Durchführung mehrerer Selektionsrunden via Phagen-Display. Eine solche Selektionsrunde beginnt mit der Inkubation einer Trypsiligase-basierten Phagenbibliothek mit einem immobilisierten Substrat, welches die Erkennungssequenz YRH beinhaltet (1). Nach Ausbildung von kovalent gebundenen Acyl-Enzym-Phagen-Intermediaten (2) werden nicht bindende oder schnell hydrolysierende Trypsiligase-Varianten durch mehrere Waschschriffe entfernt (3). Die Zugabe von Nukleophil, welches über ein N-terminales RH-Motiv verfügt, führt zur Elution gebundener Phagen durch eine Deacylierung der Acyl-Enzym-Phagen-Intermediate via Aminolyse (4). Hierbei hängt die Effektivität der Phagenelution von der Transamidierungsaktivität der präsentierten Trypsiligase-Variante ab. Anschließend werden die eluierten Trypsiligase-Phagen zur Infektion von *E. coli* ER2738 mit den korrespondierenden Phagemiden verwendet (5). Eine Amplifikation der selektierten Trypsiligase-Varianten erfolgt durch eine Superinfektion der zuvor infizierten *E. coli*-Zellen mit einem Helferphagen (6). Die resultierende Phagenbibliothek nächster Generation kann einer erneuten Selektionsrunde unterzogen werden (1) oder sie wird mittels eines *ELISA*-basierten Screenings hinsichtlich verbesserter Biokatalysatoren durchgemustert (7).

Da das Fusionsprotein aus Trypsiligase und C-terminaler Domäne des Phagenhüllproteins pIII toxisch für *E. coli* ist und damit die Wachstumsgeschwindigkeit mindert, besitzen *escape*-Mutanten einen wesentlichen Wachstumsvorteil bei der Herstellung von Phagen durch *E. coli*.

Dies wiederum führte dazu, dass nur eine Selektionsrunde durchgeführt werden konnte, da nach weiteren Selektionsrunden *escape*-Mutanten die dominierende Spezies darstellten. Dennoch konnten bereits nach einer Selektionsrunde zwei Trypsiligase-Varianten identifiziert werden, welche eine verminderte Produkthydrolyse aufwiesen. Jedoch zeigten diese Biokatalysatoren im Vergleich zur nativen Trypsiligase lediglich vergleichbare Produktausbeuten. Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen besteht im Arbeitskreis BORDUSA ein großes Interesse an der weiteren Optimierung des evolutionären Engineerings von Trypsiligase, um hierdurch Biokatalysatoren mit deutlich verbesserter Effizienz hinsichtlich der katalysierten Transamidierungsreaktion zu erhalten.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Optimierung der Trypsinvariante Trypsiligase zur C-terminalen Modifikation von Proteinen. Der Fokus liegt auf der Entwicklung eines Biokatalysators, welcher die effiziente Herstellung ortsspezifisch modifizierter Antikörper-Wirkstoff-Konjugate ermöglicht. Hierfür soll Trypsiligase über ein evolutionäres Enzym-Engineering hinsichtlich der katalysierten Transamidierungsreaktion verbessert werden. Dieses gliedert sich in die Konstruktion einer DNA-Bibliothek, der Anreicherung verbesserter Biokatalysatoren durch Selektion mittels Phagen-Display sowie einem Screening zur Identifizierung optimierter Enzymvarianten. Grundlage hierfür war der Nachweis, dass sich das Phagen-Display als Selektionsmethode für die Anreicherung syntheseoptimierter Trypsinvarianten prinzipiell eignet.

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Optimierung der Selektion mittels Phagen-Display. Dabei liegt der Fokus auf der Reduktion von *escape*-Mutanten, welche die Effizienz des Phagen-Displays stark limitieren. Diese Optimierung umfasst im Wesentlichen zwei Schwerpunkte:

- (i) die Generierung einer qualitativ hochwertigen Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek, sodass der Anteil von *escape*-Mutanten bereits in der naiven DNA-Bibliothek gering gehalten wird,
- (ii) die Konstruktion eines neuen Phagemids, welches die Anreicherung von *escape*-Mutanten während der Propagierung von Trypsin-präsentierenden Phagen unterbindet.

Dies soll die Durchführung mehrerer Selektionsrunden ermöglichen, wobei die Stringenz der Selektion über diverse Parameter, wie beispielsweise die Substratmenge, die Anzahl und Dauer von Waschschrritten sowie die Variation der Elutionszeit, sukzessive erhöht werden soll. Desweiteren soll für die Identifizierung von potentiell verbesserten Biokatalysatoren ein

ELISA-basiertes Hochdurchsatz-Screening etabliert werden, welches die zeitaufgelöste Detektion der Produktbildung für eine Vielzahl von Enzymvarianten ermöglicht. Nach erfolgreicher Selektion und Identifizierung sollen die potentiell verbesserten Biokatalysatoren rekombinant hergestellt werden. Anschließend erfolgt die primäre Charakterisierung mittels Modelltransamidierung unter Verwendung von geeigneten Peptidsubstraten. Der Biokatalysator mit der höchsten Produktausbeute soll weiterführend hinsichtlich biophysikalischer sowie enzymkinetischer Eigenschaften charakterisiert werden. Dies soll im Wesentlichen Untersuchungen zur Enzymspezifität, zur pH- und Temperaturabhängigkeit sowie eine detaillierte Betrachtung der enzymkatalysierten Transamidierungsreaktion umfassen, was letztlich eine genauere Beurteilung der Syntheseeffizienz ermöglichen soll. Abschließend soll die Eignung des Biokatalysators hinsichtlich der Generierung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten untersucht werden. Hierzu sollen zwei therapeutisch relevante Fab-Fragmente mit unterschiedlichen Funktionalitäten (Farbstoff, Toxin, Polymer) modifiziert werden. Neben einer Untersuchung der Syntheseeffizienz in Abhängigkeit vom eingesetzten Fab-Fragment sowie der entsprechenden Funktionalität soll auch ein möglicher Einfluss der enzymkatalysierten Modifikation auf die Bindungsfunktionalität der resultierenden Fab-Fragment-Konjugate analysiert werden.

2 Material

In dem folgenden Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgeführt.

2.1 Chemikalien/Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (Tab. 2) besitzen alle, sofern nicht gesondert angegeben, den Reinheitsgrad p.A. (pro analysi).

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
2-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Aceton	VWR International GmbH (Darmstadt)
Acetonitril	VWR International GmbH (Darmstadt)
4-(2-Aminoethyl)benzonsulfonylfluorid (AEBSF)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Agar	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ammoniumsulfat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Anhydrotetracyclin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Bovines Serum Albumin (BSA)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Bromphenolblau	SERVA GmbH (Heidelberg)
Calciumchlorid	AppliChem GmbH (Darmstadt)
D(-)-Sorbitol	AppliChem GmbH (Darmstadt)
D(+)-Glucose	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Di-Natriumhydrogenphosphat	VWR International GmbH (Darmstadt)
DL-Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Essigsäure, 100 %	VWR International GmbH (Darmstadt)
Ethanol, reinst	VWR International GmbH (Darmstadt)
Ethanol, technisch	VWR International GmbH (Darmstadt)
Formaldehyd, 37 %	Merck (Darmstadt)
Glycerin, 99,5 %	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Hefeextrakt	AppliChem GmbH (Darmstadt)

Chemikalien	Hersteller
Hydroxyethyl-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Isopropanol	VWR International GmbH (Darmstadt)
Kaliumchlorid	VWR International GmbH (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	VWR International GmbH (Darmstadt)
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Methanol	VWR International GmbH (Darmstadt)
Natriumacetat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumcarbonat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumchlorid	VWR International GmbH (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	VWR International GmbH (Darmstadt)
Natriumdisulfit	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumhydroxid	VWR International GmbH (Darmstadt)
Natriumsulfat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumthiosulfat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Polyethylenglycol 4000 (PEG 4000)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Schwefelsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Silbernitrat	Merck KGaA (Darmstadt)
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Tetracyclin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trifluoressigsäure (TFA)	VWR International GmbH (Darmstadt)
TMB (Tetramethylbenzidin) One	Kem-En-Tec Diagnostics A/S (Dänemark)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Trypton	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Tween 20	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Wasser, nukleasefrei	Fermentas (St. Leon-Rot)
Yeast nitrogen base without amino acids (YNB w/o AS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Zeocin	InvivoGen (San Diego, Californien)
Zinkchlorid	AppliChem GmbH (Darmstadt)

2.2 Puffer und Lösungen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen (Tab. 3) wurden mit bidestiliertem Wasser angesetzt. Der pH-Wert wurde bei Bedarf mit konzentrierter Essigsäure, Salzsäure, Natriumhydroxidlösung und Kaliumhydroxidlösung eingestellt. Falls angegeben, wurden entsprechende Puffer und Lösungen für 45 min bei 121 °C und 1,2 bar autoklaviert oder mittels Spritzenfilter (Porengröße: 0,45 µm) steril filtriert. Die Puffer für die Chromatographie wurden steril filtriert und entgast.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE	
1 x SDS-PAGE-Laufpuffer	10 % (v/v) 10 x SDS PAGE Laufpuffer
Trenngelpuffer	1,5 M TRIS-HCl; pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS-HCl; pH 6,8
3 x SDS-Probenpuffer	12,5 % (v/v) Sammelgelpuffer; 40 % (v/v) Glycerin; 2,3 % (w/v) SDS; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol (optinal); 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8
10 % SDS-Stammlösung	10 % (w/v) SDS
10 % APS-Stammlösung	10 % (w/v) APS
Rotiphorese® Gel 30	30 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1 (von Carl Roth)
Lösungen für die Silber-Färbung	
AgNO ₃ -Lösung	20 % (w/v) Silbernitrat
Na ₂ S ₂ O ₃ -Lösung	10 % (w/v) Natriumthiosulfat
TCA-Lösung	50 % (w/v) Trichloressigsäure
Fixierlösung	50 % (v/v) Aceton; 2,5 % (v/v) TCA-Lösung; 0,04 % (v/v) Formaldehyd
Vorbehandlungslösung I	50 % (v/v) Aceton
Vorbehandlungslösung II	0,16 % (v/v) Na ₂ S ₂ O ₃ -Lösung
Imprägnierlösung	1,4 % (v/v) AgNO ₃ -Lösung; 1 % (v/v) Formaldehyd
Entwicklerlösung	2 % (w/v) Natriumcarbonat; 0,04 % (v/v) Formaldehyd; 0,04 % (v/v) Na ₂ S ₂ O ₃ -Lösung
Stopplösung	1 % (v/v) Essigsäure
Lösungen für die Coomassie-Blau-Färbung	
Coomassie-Färbelösung	30 % (v/v) Methanol; 17,5 % (v/v) Ethanol; 1 0% (v/v) Essigsäure; 0,2 % (w/v) Coomassie R250; 0,05 % (w/v) Coomassie G250
Entfärberlösung	4 5% (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese	
1 x TAE	10 % (v/v) 50 x TAE
DNA-Ladepuffer	6 x Orange DNA Loading Dye [®] (Fermentas)
DNA-Färbelösung	0,01 % (v/v) SYBR [®] Safe DNA gel stain
Puffer für die Kationenaustauschchromatographie	
Tn-Puffer A (Bindepuffer)	20 mM Natriumacetat; pH 4,0
Tn-Puffer B (Elutionspuffer)	100 mM HEPES; 200 mM NaCl; 10 mM CaCl ₂ ; pH 7,8 bei 30 °C
Fab-Puffer A (Bindepuffer)	100 mM HEPES; pH 7,0
Fab-Puffer B (Elutionspuffer)	100 mM HEPES; 250 mM NaCl; pH 7,0
Puffer für die Protein G-Affinitätschromatographie	
Puffer A (Bindepuffer)	20 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,0
Puffer B (Elutionspuffer)	100 mM Glycin-HCl; pH 2,7
Puffer C (Neutralisierungspuffer)	1 M TRIS-HCl; pH 9,0
Zellaufschlusspuffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ ; 0,1 mM AEBSF; pH 7,0
Puffer für die hydrophobe Interaktionschromatographie	
HIC-Puffer A	1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 50 mM HEPES; pH 7,5
HIC-Puffer B	50 mM HEPES; pH 7,5
HIC-Puffer C	100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl ₂ ; pH 7,8 bei 30 °C
Puffer für die Größenausschlusschromatographie	
SEC-Laufpuffer	100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl ₂ ; pH 7,8 bei 30 °C
Puffer für das Phagen-Display	
TP	100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl ₂ ; pH 7,8 bei 30 °C; steril filtriert
TPT0,1	Puffer TP; 0,1 % (v/v) Tween20
TPB	Puffer TP; 1 % (w/v) BSA
TPBT0,05	Puffer TPB; 0,05 % (v/v) Tween20
PEG-Lösung	30 % (w/v) Polyethylenglycol 4000; 2,5 M NaCl
Puffer und Lösungen zur Herstellung von elektrokompetenter <i>Pichia pastoris</i>-Zellen	
BEDS-Puffer	10 mM Bicin; 3 % (w/v) Ethylenglycol; 5 % (v/v) DMSO; 1 M D(-)-Sorbitol; pH 8,3; autoklaviert
DTT-Stammlösung	1 M DTT; steril filtriert
Sorbitol-Stammlösung	1 M D(-)-Sorbitol; steril filtriert
Puffer und Lösungen für das ELISA-basierte Screening	
TBS	10 % (v/v) 10 x TBS; steril filtriert
TBST0,05	10 % (v/v) 10 x TBS; 0,05 % (v/v) Tween

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
Messpuffer	100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl ₂ ; pH 7,8 bei 30 °C; steril filtriert
Abstopplösung	100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl ₂ ; 2 mM EDTA; pH 3,5; steril filtriert
Puffer für die enzymatische Charakterisierung	
Messpuffer	100 mM HEPES; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl ₂ ; pH 7,8 bei 30 °C; steril filtriert
Sonstige Puffer und Lösungen	
10 x PBS	1,37 M NaCl; 270 mM KCl; 800 mM Na ₂ HPO ₄ ; 150 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
10 x TBS	0,5 M TRIS-HCl; 1,5 M NaCl; pH 7,4
50 x TAE	1 M TRIS-HCl; 1 M Essigsäure; 0,1 M EDTA; pH 8,0
10 x <i>blocking</i> -Puffer	10 % (w/v) Casein (von Sigma-Aldrich)
10 x SDS PAGE-Laufpuffer	0,25 M TRIS-HCl; 1,9 M Glycin; 1 % (w/v) SDS; pH 8,3
ZnCl ₂ -Stammlösung	10 mM ZnCl ₂ in H ₂ O; steril filtriert
10 x MES-Puffer	500 mM MES; 100 mM CaCl ₂ ; pH 6,0; steril filtriert
10 x Glucoselösung	20 % (w/v) D(+)-Glucose; autoklaviert

2.3 Nährmedien und Antibiotika

Alle für die Kultivierung von Mikroorganismen benötigten Nährmedien sind in Tabelle 4 aufgeführt. Diese wurden unmittelbar nach der Herstellung für 45 min bei 121 °C und 1,2 bar autoklaviert, wobei temperaturempfindliche Lösungen separat nach dem Autoklavieren steril filtriert hinzugegeben wurden.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Nährmedien.

Nährmedium	Hersteller/Zusammensetzung
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl; pH 7,0; autoklaviert
LB-Agar	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl; 1,5 % (w/v) Agar; pH 7,0; autoklaviert
YPD-Medium	1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Pepton; autoklaviert; 10 % (v/v) 10 x Glucoselösung
YPD-Agar	1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Pepton; 2 % (w/v) Agar; autoklaviert; 10 % (v/v) 10 x Glucoselösung

Nährmedium	Hersteller/Zusammensetzung
YPDS-Agar	1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Pepton; 2 % (w/v) Agar; autoklaviert; 10 % (v/v) 10 x Glucoselösung; 1 M D(-)-Sorbitol
BM-Medium	1,34 % (w/v) YNB w/o AS; autoklaviert; 10 % (v/v) 10 x MES-Puffer
BMD-Medium	1,34 % (w/v) YNB w/o AS; autoklaviert; 10 % (v/v) 10 x MES-Puffer; 10 % (v/v) 10 x Glucoselösung
SOC-Medium	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
2xYT-Medium	1,6 % (w/v) Trypton; 1 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl; pH 7,0; autoklaviert
2xYT-Agar	1,6 % (w/v) Trypton; 1 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl; 1,5 % (w/v) Agar; pH 7,0; autoklaviert

Die in Tabelle 5 angegebenen Antibiotika wurden steril filtriert und dem Medium bei Bedarf hinzugegeben.

Tabelle 5: Liste der Verwendeten Antibiotika.

Antibiotikum	Zusammensetzung der Stammlösung	Endkonzentration im Nährmedium
Carbenicillin	100 mg/ml in ddH ₂ O	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in ddH ₂ O	50 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml in Ethanol	10 µg/ml
Anhydrotetracyclin	2 mg/ml in Ethanol	0,02-0,2 µg/ml
Zeocin	100 mg/ml ddH ₂ O	25-100 µg/ml

2.4 Mikroorganismen

Tabelle 6 und 7 zeigen eine Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme der Spezies *Escherichia coli* (*E. coli*) sowie Hefestämme der Spezies *Pichia pastoris* (*P. pastoris*).

Tabelle 6: Liste der verwendeten *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
DH5alpha	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK⁻ mK⁺), λ⁻</i>	Institut für Genetik MLU Halle/Wittenberg
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB⁻ mB⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	[174]

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
ElectroTen-Blue	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ $endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1$ $lac Kanr [F' proAB lacI^q \Delta M15 Tn10$ $(Tet^r)]$	Agilent Technologies (Santa Clara, CA)
NEB 5-alpha	$fhuA2 \Delta(argF-lacZ)UI69 phoA glnV44$ $\Phi80 \Delta(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1$ $endA1 thi-1 hsdR17$	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
NEB 10-beta	$\Delta(ara-leu) 7697 araD139 fhuA \Delta lacX74$ $galK16 galE15 e14-$ $\phi80dlacZ\Delta M15 recA1 relA1 endA1$ $nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 \Delta(mrr-$ $hsdRMS-mcrBC)$	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
XL1-Blue	$endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac$ $glnV44 F'[::Tn10 proAB^+ lacIq$ $\Delta(lacZ)M15] hsdR17(rK mK^+)$	Stratagene (La Jolla, CA)
ER2738	$[F'proA+B+ lacIq \Delta(lacZ)M15 zzf::Tn10$ $(tetr)] fhuA2 glnV\Delta(lac-proAB) thi-1$ $\Delta(hsdS-mcrB)5$	Lucigen Corporation (Middleton, WI)

Tabelle 7: Liste der verwendeten Hefestämme.

Stamm	Genotyp	Phänotyp	Bezugsquelle
<i>P. pastoris</i> X33	wt	Mut ⁺	Invitrogen™ Life Technologies (Darmstadt)

2.5 Helferphage

Der in Tabelle 8 gelistete Helferphage wurde für die Superinfektion von *E.coli*-Zellen verwendet.

Tabelle 8: Beschreibung des verwendeten Helferphagens.

Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
M13K07 Helferphage	M13K07 ist ein Derivat des filamentösen Bakteriophagen M13 und besitzt die Mutation M40I im Gen von pII sowie einen p15A Ori und eine Kanamycin-Resistenzkassette	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)

2.6 Plasmide

Die in Tabelle 9 gelisteten Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Genotyp	Referenz
pSCIL-PhD10_4Tn	Phagemidvektor, welcher unter der Transkriptionskontrolle eines <i>tac</i> -Promotor/Operators steht und zur Expression eines Fusionsproteins verwendet wird. Dieses besteht aus <i>pelB</i> -Signalsequenz, Trypsiligase, MyCUT- <i>tag</i> als Linker sowie C-terminalem Fragment des Phagenhüllproteins pIII (AS 252-406). Das Gen für Trypsiligase wurde nicht auf die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i> optimiert.	Scil Proteins GmbH (Halle/Saale) modifiziert von Sabrina Gissel (AG BORDUSA, MLU Halle-Wittenberg)
pASK-IBA7 Plus	Plasmid, welches unter der Transkriptionskontrolle eines <i>tetA</i> -Promotor/Operators steht und zur Expression eines gewünschten Zielproteins verwendet wird.	IBA GmbH (Göttingen)
pETSoSc1_sfGFP	Plasmid, welches unter der Transkriptionskontrolle eines T7-Promotors steht und zur Expression von sfGFP verwendet wird.	Patrick Studte (AG Künstliche Bindeproteine, MLU Halle-Wittenberg)
pInSAlect_NWG-1	Plasmid zur Durchführung einer Leserahmenselektion.	Sven Pfeifer (AG Künstliche Bindeproteine, MLU Halle-Wittenberg)
pMB-03_4Tn	Phagemidvektor, welcher unter der Transkriptionskontrolle eines <i>tetA</i> -Promotor/Operators steht und zur Expression eines Fusionsproteins verwendet wird. Dieses besteht aus <i>pelB</i> -Signalsequenz, Trypsiligase, MyCUT- <i>tag</i> als Linker sowie C-terminalem Fragment des Phagenhüllproteins pIII (AS 252-406). Das Gen für Trypsiligase wurde auf die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i> optimiert.	diese Arbeit
pMB-03_sfGFP	Phagemidvektor, welcher unter der Transkriptionskontrolle eines <i>tetA</i> -Promotor/Operators steht und zur Expression eines Fusionsproteins verwendet wird. Dieses besteht aus <i>pelB</i> -Signalsequenz, sfGFP, MyCUT- <i>tag</i> als Linker sowie C-terminalem Fragment des Phagenhüllproteins pIII (AS 252-406).	diese Arbeit
Plasmid	Genotyp	Referenz
pMB-04_4Tn	Phagemidvektor, welcher unter der Trans-	diese Arbeit

	<p>kriptionskontrolle eines <i>tet</i>-Promotor/Operators steht und zur Expression eines Fusionsproteins verwendet wird. Dieses besteht aus pelB-Signalsequenz, sfGFP, MyCUT-tag als Linker sowie C-terminalem Fragment des Phagenhüllproteins pIII (AS 252-406). Das Gen für Trypsiligase wurde auf die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i> optimiert.</p>	
pMB-04_LibMB	<p>Phagemidvektor, welcher unter der Transkriptionskontrolle eines <i>tet</i>-Promotor/Operators steht und zur Expression eines Fusionsproteins verwendet wird. Dieses besteht aus pelB-Signalsequenz, sfGFP, MyCUT-tag als Linker sowie C-terminalem Fragment des Phagenhüllproteins pIII (AS 252-406).</p>	diese Arbeit
pPICZ α A_LibMB_4RdA	<p>Plasmid, welches für die stabile Intergration einer Gensequenz in das Genom von <i>Pichia pastoris</i> verwendet wird. Dies sind Gensequenzen selektierter Trypsiligase-Varianten aus der vierten Runde der Selektion A. Die Transkriptionskontrolle erfolgt via <i>AOX1</i>-Promotor. Die Sekretion des POI's wird durch einen α-mating Faktor aus <i>Saccharomyces cerevesiea</i> vermittelt.</p>	diese Arbeit
pPICZ α A_LibMB_4RdB	<p>Plasmid, welches für die stabile Intergration einer Gensequenz in das Genom von <i>Pichia pastoris</i> verwendet wird. Dies sind Gensequenzen selektierter Trypsiligase-Varianten aus der vierten Runde der Selektion B. Die Transkriptionskontrolle erfolgt via <i>AOX1</i>-Promotor. Die Sekretion des POI's wird durch einen α-mating Faktor aus <i>Saccharomyces cerevesiea</i> vermittelt.</p>	diese Arbeit
pPICZ α A_4Tn	<p>Plasmid, welches für die stabile Intergration der Gensequenz von Trypsiligase in das Genom von <i>Pichia pastoris</i> verwendet wird. Die Transkriptionskontrolle erfolgt via <i>AOX1</i>-Promotor. Die Sekretion des POI's wird durch einen α-mating Faktor aus <i>Saccharomyces cerevesiea</i> vermittelt.</p>	R. WARTNER (AG BORDUSA, MLU Halle-Wittenberg)

Plasmid	Genotyp	Referenz
pASK- α Her2-cMyc	Plasmid, welches unter der Transkriptionskontrolle eines tetA-Promotor/Operators steht und zur Expression eines Her2-spezifischen Fab-Fragments verwendet wird. Der C-Terminus der schweren Kette wurde um die Aminosäuresequenz YRHAAG-cMyc erweitert.	K. GÖLDNER (AG BORDUSA, MLU Halle-Wittenberg)
pASK- α Her2-TAAYRH-cMyc	Plasmid, welches unter der Transkriptionskontrolle eines tetA-Promotor/Operators steht und zur Expression eines Her2-spezifischen Fab-Fragments verwendet wird. Der C-Terminus der schweren Kette wurde um die Aminosäuresequenz AAYRHAAG-cMyc erweitert.	diese Arbeit
pASK-Cimzia-TAAYRH-cMyc	Plasmid, welches unter der Transkriptionskontrolle eines tetA-Promotor/Operators steht und zur Expression eines TNF α -spezifischen Fab-Fragments verwendet wird. Der C-Terminus der schweren Kette wurde um die Aminosäuresequenz AAYRHAAG-cMyc erweitert.	diese Arbeit

2.7 DNA-Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten *primer* (Tab. 10) wurden von der Invitrogen™ Life Technologies (Darmstadt) in lyophilisierter Form bezogen. Diese wurden mit autoklaviertem und steril filtriertem Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 100 μ M eingestellt.

Tabelle 10: Liste der verwendeten *primer*.

<i>primer</i>	Oligonukleotidsequenz von 5' nach 3'
pASK_fwd	CAAAAATCTAGATAAGAAGGAAGAAAAATAATGAAAT ACCTATTGC
pASK_rev	CAGGTCAAGCTTTTATTAAGACTCCTTATTACGCAG
sfGFP_Sfi_fwd	CTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCAGTAAAGGCGAAG
sfGFP_Sfi_rev	TCTGCGGCCTGTTTGGCCCCTTTATACAGCTCG
LibMB_SF_fwd	CTACATACCGGTGCCATGGCCATTGTTGGTGGTTATAC
LibMB_SF_rev	AATACCACGCGTCTCACCGCTATTCAGGCTAAC
LibMB_IF1_fwd	CTACATACCGGTCTCCACTGTTATGAAAGC
LibMB_IF1_rev	AATACCACGCGTCTCAAAGTTCGGGTGTTTGATG

<i>primer</i>	Oligonukleotidsequenz von 5' nach 3'
LibMB_IF2_fwd	CTACATACCGGTCTCAACGATATCATGCTG
LibMB_IF2_rev	AATACCACGCGTCTCCTTGCCACCTTCCAG
LibMB_EF_fwd	CTACATACCGGTCTCGACAGCGGTGGTCCGGTTG
LibMB_EF_rev	GTACGTACGCGTGTTACCGCTACCGGATCC
Midlibs_fwd_seq	ATTTGTGCGCCGAGTATAAG
Midlibs_fwd	CCAGACTTACGCTCCAATTC
Midlibs_rev	TCTGCGTTAACCGAGACTAC
4TnLib_RF_anti	GTGAATACCACGCGTCTC
Seq_pelB_pMB	CTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTG
sfGFP_Sfi_fwd	CTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCAGTAAAGGCGAAG
sfGFP_Sfi_rev	TCTGCGGCCTGTTTGGCCCCTTTATACAGCTCG
Seq_pIII_pMB	TTATATGTTGCCACCTTTATGTATG
pIB4_seq_fwd	CTGGTTCCAATTGACAAGC
4xTn_pPICZalpha_fwd	AGCCTACATCTCGAGAAAAGGATTGTTGGTGGTTATAC CTGTC
4xTn_pPICZalpha_rev	GTGAATACCACCGGTTTATTAGTTGGCTGCAATG- GTGTCCTG
Her2_TAAYRH_fwd	GCAGCATATCGCCATGCGGCGGGC
Her2_TAAYRH_rev	GGTTTTATCCGCGCAGCTTTTTCGG
pASK-for-Her2	GAGTTATTTTACCACTCCCT
pASK-rev-Her2	CGCAGTAGCGGTAAACG

2.8 Peptide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Peptide sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die Synthese und Reinigung der Peptide wurde freundlicherweise von Frau S. KAUFMANN, Frau B. HARTRODT und Herrn C. MEYER durchgeführt. Die Reinheit der Peptide wurde mittels UPLC-Analyse bei einer Wellenlänge von 220 nm überprüft und liegt bei > 90 %. Die Identität der Peptide wurde mittels Massenspektrometrie bestätigt.

Tabelle 11: Liste der verwendet Peptide für enzymatische Reaktionen.

Peptidsequenz	Molekulargewicht (Da)	Analytik (UPLC, LC-MS)
Bz-AAyrHAAG-OH	919,99	Abbildung A1A, S. 173
Bz-AARRHAAG-OH	913,01	Abbildung A1B, S. 173
Bz-AAWRHAAG-OH	943,03	Abbildung A1C, S. 173
Bz-AAFRHAAG-OH	904,00	Abbildung A2A, S. 174

Peptidsequenz	Molekulargewicht (Da)	Analytik (UPLC, LC-MS)
Bz-AADRHAAG-OH	871,91	Abbildung A2B, S. 174
Bz-AALRHAAG-OH	869,98	Abbildung A2C, S. 174
Bz-AAARHAAG-OH	827,90	Abbildung A3A, S. 175
Bz-AAYKHAAG-OH	891,98	Abbildung A3B, S. 175
Bz-AAYAHAAG-OH	834,89	Abbildung A3C, S. 175
Bz-AAYRAAAG-OH	853,94	Abbildung A4A, S. 176
Bz-AAYRKAAG-OH	910,56	Abbildung A4B, S. 176
Bz-AAYDHAAG-OH	878,89	Abbildung A4C, S. 176
Bz-AAYRNAAG-OH	896,95	Abbildung A5A, S. 177
Bz-TAYRHAAG-OH	950,01	Abbildung A5B, S. 177
Bz-THYRHAAG-OH	1016,17	Abbildung A5C, S. 177
Bz-HTAYRHAAG-OH	1087,15	Abbildung A6A, S. 178
Bz-THAYRHAAG-OH	1087,15	Abbildung A6B, S. 178
Bz-THTYRHAAG-OH	1117,17	Abbildung A6C, S. 178
Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH	1244,38	Abbildung A7A, S. 179
H-RHAAGEQKLISEEDL-OH	1694,83	Abbildung A7B, S. 179
H-RHAK(CF)-OH	868,91	Abbildung A7C, S. 179
H-RHAK(MCC-DM1)-OH	1468,01	Abbildung A8C, S. 180
H-RHAK-OH	510,59	
H-RHAK(PEG20k)AAK(DNP)-OH	ca. 21000	

2.9 Enzyme und sonstige Proteine

Folgend sind Enzyme sowie andere Proteine (Tab. 12) aufgelistet, die zur Erstellung dieser Arbeit notwendig waren.

Tabelle 12: Liste der verwendeten Enzyme und anderer Proteine.

Enzym/Protein	Bezugsquelle
Polymerasen	
Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
Taq DNA-Polymerase	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
Klenow-Fragment	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
Restriktionsenzyme	
AgeI-HF	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
AleI-HF	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
BamHI-HF	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
BsmBI-HF	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)

Enzym/Protein	Bezugsquelle
BssSI-HF	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
BsaI-HF	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
HindIII-HF	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
MluI	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
NcoI-HF	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
ScaI-HF	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
SacI-HF	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
SfiI	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
XbaI	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
XhoI	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
Alkalische Phosphatase	
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
DNA-Ligase	
T4-DNA-Ligase (400 U/μl)	New England BioLabs GmbH (Frankfurt a. M.)
Immunkonjugate	
Anti-cMyc-Antikörper (Maus) (αcMyc-AK)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Anti-Maus-HRP-Konjugat (Kaninchen) (αMaus-HRP)	Life Technologies (Darmstadt)
Anti-M13-HRP-Konjugat (Maus)	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Anti-Human IgG-HRP-Konjugat (Ziege) (Fab-spezifisch)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Fab-Fragmente	
Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc	K. GÖLDNER (AG BORDUSA, MLU Halle-Wittenberg)
Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc	diese Arbeit
Anti-TNFα-Fab-TAAYRH-cMyc	diese Arbeit
Sonstige Proteine	
Ecotin	A. SHARKHUUKHEN (AG BORDUSA, MLU Halle-Wittenberg)

2.10 Standards und Kits

In Tabelle 13 sind Standards sowie Kits aufgeführt, welche innerhalb dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 13: Liste der verwendeten Standards und Kits.

Bezeichnung	Bezugsquelle
DNA-Molekulargewichts-Standard	
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)
Protein-Molekulargewichts-Standard	
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)
DNA-Isolation	
Wizard® Plus SV Miniprep Kit	Promega Corp. (Madison, WI, USA)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit	Macherey-Nagel GmbH (Berlin)
Plasmid-Isolation	
Wizard® SV Gel and PCR Clean up System	Promega Corp. (Madison, WI, USA)
NucleoSpin® Plasmid kit	Macherey-Nagel GmbH (Berlin)

2.11 Geräte und Zubehör

In Tabelle 14 sind Geräte sowie Zubehör aufgeführt, welche für die Erstellung dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 14: Liste der verwendeten Geräte und Zubehör.

Geräte und Zubehör	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Einheiten	
Owl B1A EasyCast Mini Gel System	Thermo Scientific Owl Separation Systems (Rochester)
Owl B1 EasyCast Mini Gel System	Thermo Scientific Owl Separation Systems (Rochester)
Owl B2 EasyCast Mini Gel System	Thermo Scientific Owl Separation Systems (Rochester)
Autoklav	
HiClave Dampfsterilisator	HCM (Tüßling)
Brutschrank	
INB 400	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach)

Geräte und Zubehör	Hersteller
Chromatographie-Einheiten	
ÄKTAprime Plus	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Breeze™-HPLC-System	Waters GmbH (Eschborn)
ACQUITY UPLC-System	Waters GmbH (Eschborn)
Chromatographie-Säulen	
HiPrep™ SP FF 20 ml	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
HiTrap™ Protein G HP 1 ml	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 prep grade	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Superose® 12 10/300 GL	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
TSKgel Butyl-NPR	Tosoh Bioscience LLC (Philadelphia, USA)
Dynabeads	
Dynabeads® M-270 Streptavidin	Invitrogen Corp. (Carlsbad)
Dynabeads® M-280 Streptavidin	Invitrogen Corp. (Carlsbad)
Elektroporationsgerät	
ECM 630	BTX® Harvard Apparatus (Holiston)
Multiporator	Eppendorf AG (Hamburg)
Folien für Mikrotiterplatten	
Breath-easy	Sigma (St.Louis)
Aluminum Seal Tape	Nalge Nunc International (Rochester)
Geldokumentation	
BioVision 3000	Vilber Lourmat Deutschland GmbH (Eberhardzell)
Küvetten	
TrayCell (Typ Nr. 105.810-UVS)	HELLMA GmbH & Co. KG (Müllheim)
Deckel 1 mm (Typ Nr. 665.703)	
Deckel 0,2 mm (Typ Nr. 665.704)	
Elektroporationsküvette 1 mm	BTX® Harvard Apparatus (Holiston)
Elektroporationsküvette 2 mm	
Laborautomatisierung	
Biomek® FX ^P	Beckman Coulter Inc. (Fullerton)
QPix2	Genetix (München)
PlateMaster	Gilson International (Limburg an der Lahn)
QTray (X6023)	Molecular Devices (Germany) GmbH (Ismaning)
Laminarflowbox	
Hera Safe KS 12	Thermo Fisher Scientific GmbH (Bonn)

Geräte und Zubehör	Hersteller
Magnetrührer	
MR-Hei Standard	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
Mikrotiterplatten	
96-well, PP, U-Boden (650201)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
96-well, PS, F-Boden, <i>MaxiSorp</i>	Nalge Nunc International (Rochester)
96-well, PS, HBC, <i>Streptavidin-beschichtet</i>	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)
384-well, PS, HBC, <i>Streptavidin-beschichtet</i>	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)
96-well MultiScreen™ Filterplatte (MWCO 10 kDa)	Merck Millipore
pH-Messgerät	
InoLab® pH 720 (pH-Elektrode: SenTix 81)	WTW GmbH (Weilheim)
Schüttelinkubatoren	
TH 15	Edmund Brühler GmbH (Hechingen)
Innova® 44, 4230	New Brunswick Scientific Edison (NJ, USA)
Infors Minitron	Infors AG (Basel)
Infors Ecotron	Infors AG (Basel)
SDS-PAGE-Einheiten	
Mini-PROTEAN	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Spektrometer	
UV/Vis Spectrophotometer DU® 730	Beckman Coulter (Krefeld)
Biomek™ Paradigm	Beckman Coulter Inc. (Fullerton)
NOVOstar	BMG LABTECH GmbH (Ortenberg)
NanoPhotometer	Implen GmbH
Thermomixer	
Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg)
Thermocycler	
Tpersonal	Biometra GmbH (Göttingen)
Labcycler	SensoQuest (Göttingen)
Primus HT	Clemens (Waldbütteln)
Ultraschallgerät	
Sonifier® W-250 D	Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
Waagen	
SI-234	Denver Instruments GmbH (Göttingen)
SI-2002	Denver Instruments GmbH (Göttingen)
MXX-2001	Denver Instruments GmbH (Göttingen)

Geräte und Zubehör	Hersteller
Zentrifugen	
Allegra X-15 R (Rotoren: SX4750A, FX6100)	Beckman Coulter (Krefeld)
Galaxy mini	VWR (Darmstadt)
Heraeus® Fresco™ 21	Thermo Fisher Scientific GmbH (Bonn)
Heraeus® Biofuge Fresco	Thermo Fisher Scientific GmbH (Bonn)
Zentrifugalkonzentratoren	
Millipore Amicon Ultra-4 (MWCO 10 kDa)	Merck Millipore
Millipore Microcon YM-10 (MWCO 10 kDa)	Merck Millipore

2.12 Software

In Tabelle 15 ist die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Software aufgelistet.

Tabelle 15: Liste der verwendeten Software.

Bezeichnung	Hersteller
MassLynx 4.1	Waters GmbH (Eschborn)
Sigmaplot 11.0	Systat Software, Inc
Pymol	DeLano Scientific LLC (Palo Alto)
UNICORN 4.11	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Clonemanager 9 Professional Edition	Scientific & Educational Software (Cary)
SnapGene 1.1.3	GSL Biotech LLC
Protparam	https://web.expasy.org/protparam/
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation
Mendeley Desktop 1.17.10	Mendeley Ltd. (London)
Breeze 3.30	Waters GmbH (Eschborn)

3 Methoden

In dem folgenden Kapitel werden molekularbiologische, mikrobiologische und proteinchemische Methoden sowie experimentelle Rahmenbedingungen aufgeführt, welche für die Erstellung dieser Arbeit eingesetzt wurden.

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte mittels Wizard[®] Plus SV Miniprep Kit von Promega oder dem NucleoSpin[®] Plasmid kit von Macherey-Nagel. Die Präparation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei für den Elutionsschritt 50-100 µl hochreines Wasser verwendet wurden.

3.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus *P. pastoris*

Die Isolierung von genomischer DNA aus *P. pastoris*-Zellen erfolgte mittels *Yeast DNA Extraction* Kit von Thermo Scientific. Die Präparation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten sowie von Genen aus Plasmiden erfolgte durch die Polymerase-Kettenreaktion.^[175] Für die Durchführung einer präparativen PCR, bei der die amplifizierte DNA für weitere molekularbiologische Arbeiten verwendet werden sollte, wurde die Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) verwendet. Die Ansatzgröße betrug hierbei 50 µl. Im Falle einer analytischen PCR kam die Taq Polymerase (NEB) zum Einsatz. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes entsprach jeweils den Angaben des Herstellers. Die PCR wurde in einem auf 98 °C vorgeheizten Thermocycler (vgl. 2.2, S. 35) durchgeführt. Die benötigte initiale Denaturierung des DNA-Doppelstranges erfolgte temperaturinduziert für 60 s bei 98 °C. Anschließend folgten 25-35 Zyklen, bestehend aus den drei Reaktionsschritten Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Die Reaktionsbedingungen für einen Zyklus sind wie folgt:

Denaturierung:	20 s bei 98 °C
Hybridisierung:	15 s bei 48-68 °C
DNA-Synthese:	20 s/kb bei 72 °C

Hierbei variierte die Temperatur für den Hybridisierungsschritt je nach *primer*-Sequenz. Nach Beendigung der Zyklen erfolgte ein abschließender Syntheseschritt für 5 min bei 72 °C. Eine qualitative oder quantitative Analyse erfolgte anschließend mittels der Agarose-Gelelektrophorese.

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde für analytische Zwecke die peqGOLD Universal-Agarose (peqLab) eingesetzt. Für präparative Anwendungen wurde die UltraPure™ Agarose (Invitrogen) verwendet. Die Konzentration der Agarose wurde entsprechend der erwarteten Größe der DNA-Fragmente eingestellt (Tab. 16). Die Färbung der DNA erfolgte durch Zugabe 0,01 % (v/v) SYBR® Safe zum Agarosegel. Zur Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Proben mit DNA-Ladepuffer (vgl. 2.2) versetzt und anschließend in die dafür vorgesehenen Probentaschen pipettiert. Zusätzlich zur DNA-Probe wurde ein größenspezifischer Molekulargewichtsstandard (vgl. 2.7, S. 42) aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung in TAE-Laufpuffer (vgl. 2.2, S. 35) bei 70-110 V für 1 h erfolgte die Detektion der DNA unter UV-Licht mittels Geldokumentationsanlage.

Tabelle 16: Verwendete Agarosekonzentrationen für die gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

Größe des DNA-Fragmentes [bp]	% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Laufpuffer
2000-6000	0,8
1000-2000	1
500-1000	1,5
250-500	2
100-250	4
40-100	5,5

3.1.5 DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen und PCR-Ansätzen

Die Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen und PCR-Ansätzen erfolgte mittels Wizard[®] SV Gel and PCR *Clean up System* von Promega oder dem NucleoSpin[®] *Gel and PCR Clean-up kit* von Macherey-Nagel. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des jeweiligen Herstellers, wobei für den Elutionsschritt 20-100 µl autoklaviertes und steril filtriertes Wasser verwendet wurden.

3.1.6 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung von DNA

Der enzymatische Verdau von DNA erfolgte ausschließlich mit Restriktionsendonukleasen der Firma New England BioLabs (vgl. 2.9, S. 44). Für *High-Fidelity* Enzymvarianten wurde der CutSmart[®]-Puffer eingesetzt. Bei einem Simultanverdau mit Standard-Restriktionsendonukleasen wurde der Puffer eingesetzt, welcher die höchsten Aktivitäten aller eingesetzten Endonukleasen bedingte. Der Restriktionsverdau von DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Der Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 20 µl beinhaltete 1-2 µg DNA, 2 µl des empfohlenen 10-fach-Puffers sowie jeweils 5 U Restriktionsenzym. Der Restriktionsverdau erfolgte bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur für 1-12 h. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme durch Inkubation für 20 min bei 65 bzw. 80 °C inaktiviert.

Verdaute Plasmid-DNA wurde zusätzlich mit alkalischer Phosphatase (rSAP, vgl. 2.9, S. 44) behandelt. Diese ist in der Lage, den Phosphatrest, welcher sich am 5'-Ende enzymatisch verdauter Plasmid-DNA befindet, hydrolytisch abzuspalten. Dies verhindert die intramolekulare Religierung linearisierter Plasmid-DNA während einer Ligationsreaktion. Die Dephosphorylierung mittels rSAP erfolgte hierbei nach Herstellerangaben. Zur Inaktivierung der Phosphatase wurde der Restriktionsansatz für 10 min bei 65 °C inkubiert.

Die enzymatisch verdaute DNA wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (vgl. 3.1.4, S. 51) und gereinigt (vgl. 3.1.5, S. 52).

3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von verdauter und gereinigter Insert-DNA in linearisierten Vektor mit komplementären Überhängen wurde die T4-Ligase von NEB eingesetzt (vgl. 2.9, S. 44). Für die Ligationsreaktion wurden Insert und Vektor im molaren Verhältnis 3:1 eingesetzt. Der Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 20 µl beinhaltete 300 fmol Insert-DNA, 100 fmol

Vektor, 2 µl 10-fach-Puffer sowie 400 U T4-Ligase. Nach einer Inkubation für 12 h bei 16 °C erfolgte die Inaktivierung der T4-Ligase für 10 min bei 65 °C.

3.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNA mittels UV/VIS-Spektroskopie

Die Konzentrationsbestimmung für wässrige DNA-Lösungen erfolgte mittels der UV/VIS-Spektroskopie. Hierbei wurde die Extinktion bei 230, 260 und 280 nm gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte mittels der pufferkorrigierten Extinktion bei 260 nm unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes:

$$E_{260} = \epsilon_{dsDNA} * c * d \quad (\text{Gl. 1})$$

E_{260}	= Extinktion bei 260 nm korrigiert um die Extinktion bei 320 nm
ϵ_{dsDNA}	= Extinktionskoeffizient doppelsträngiger DNA bei 260 nm in µl/(ng * cm)
c	= Konzentration der DNA-Lösung in ng/µl
d	= Schichtdicke der Küvette in cm

Der molare Extinktionskoeffizient für doppelsträngige DNA beträgt 0,02 µl/(ng * cm). Anhand des Verhältnisses der Extinktionen bei 260 zu 230 nm sowie 260 zu 280 nm konnten Verunreinigungen der DNA-Lösung mit chaotropen Salzen, respektive Proteinen, abgeschätzt werden.

3.1.9 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten sowie Plasmid-DNA erfolgte bei der Firma LGC Genomics GmbH (Berlin) durch eine Sanger-Sequenzierung.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Folgend werden Methoden zur Anzucht und Haltung von *Escherichia coli* (*E. coli*) beschrieben, welche dem Zweck der rekombinanten Proteinherstellung dienen. Die in dieser Arbeit verwendeten *E.coli* Stämme sind in Tabelle 6 gelistet.

3.2.1.1 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte zum einen durch die Hitzeschock-Methode mit chemokompetenten Zellen sowie durch Elektroporation mit elektrokompenten Zellen.^[176]

Hitzeschock-Methode

Zu einem 50 µl Aliquot schockgefrosteter chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde nach langsamem Auftauen auf Eis 1-10 ng Plasmid-DNA oder 1 µl Ligationsansatz gegeben und vorsichtig vermischt. Der Transformationsansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45-60 s bei 42 °C im Wasserbad sowie eine weitere Inkubation für 5 min auf Eis. Nun wurde der Ansatz in 1 ml vorgewärmten SOC-Medium (vgl. 2.3, S. 37) aufgenommen und für 30-45 min bei 37 °C sowie 700 rpm im Thermomixer geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf einer mit Antibiotika versehenen LB-Agarplatte (vgl. 2.3, S. 37) ausplattiert, welches eine Selektion hinsichtlich der Plasmid-lokalisierten Antibiotikaresistenz ermöglichte. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Elektroporation

Zu einem 50 µl Aliquot schockgefrosteter elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurde nach langsamem Auftauen auf Eis 1-10 ng Plasmid-DNA oder 1 µl Ligationsansatz gegeben und vorsichtig vermischt. Anschließend wurde der Transformationsansatz in eine vorgekühlte 1 mm Elektroporationsküvette (vgl. 2.11, S. 46) überführt. Die Elektroporation wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

Spannung: 1800 V

Widerstand: 200 Ω

Kapazität: 25 µF

Nach erfolgter Transformation wurde der Ansatz in 1 ml vorgewärmten SOC-Medium aufgenommen und für 30-45 min bei 37 °C sowie 700 rpm im Thermomixer geschüttelt. Anschließend wurden wie bei der Hitzeschock-Methode 100 µl des Transformationsansatzes auf einer mit Antibiotika versehenen LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Sollte Plasmid-DNA amplifiziert und anschließend präpariert werden (vgl. 3.1.1, S. 50), wurden DH5α-Zellen sowie deren Derivate NEB 5-alpha und NEB 10-beta für die Transforma-

tion eingesetzt. Zur heterologen Herstellung rekombinanter Proteine wurden BL21 (DE3)-Zellen transformiert.

3.2.1.2 Anzucht und Stammhaltung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen zum Zweck der Herstellung rekombinanter Proteine erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in Schüttelkulturen bei 30 oder 37 °C.

Die erfolgreiche Transformation von *E. coli*-Zellen mit dem gewünschten Plasmid wurde stets durch eine Sequenzierung verifiziert. Hierzu wurden 5 ml LB-Medium (vgl. 2.3, S. 37), welchem ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt wurde, mit einer Einzelkolonie einer LB-Agarplatte inokuliert. Es folgte eine Inkubation des Kulturansatzes über Nacht bei 37 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator. Von dieser Vorkultur wurden für eine Langzeitlagerung 750 µl abgenommen, mit 250 µl 86 %igem Glycerin vermischt und bei -80 °C als *glycerolstock* gelagert. Desweiteren erfolgte ein Ausstrich auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum, welche für weitere Arbeiten für bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert wurde. Mit dem verbleibenden Kulturansatz wurde eine Plasmidpräparation (vgl. 3.1.1, S. 50) durchgeführt. Die Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung eines Insert-spezifischen *primers* durch die LGC Genomics GmbH (Berlin).

3.2.1.3 Rekombinante Herstellung von Fab-Fragmenten in *E. coli*

Die rekombinante Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Fab-Fragmente (vgl. 2.9, S. 44) erfolgte in dem *E. coli*-Stamm BL 21 (DE3). Die Herstellung erfolgte hierbei in 3-l-Schüttelkolben ohne Schikane, welche mit maximal 1 l Medium beschickt wurden. In einem ersten Schritt wurde eine Vorkultur durch Inokulation von 10 bis 40 ml LB-Medium (versetzt mit 100 µg/ml Carbenicillin) mit einer Kolonie einer LB-Agarplatte oder aus einem entsprechenden *glycerolstock* heraus angesetzt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator. Anschließend wurden 1 bis 4 3-l-Schüttelkolben mit je 1 l Hauptkultur (LB-Medium versetzt mit 100 µg/ml Carbenicillin) mit der Vorkultur in einem Verhältnis von 1:100 beimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C und 140 rpm inkubiert, bis diese eine OD₆₀₀ von 1 erreichten. Nach Abkühlen der Kultur auf 30 °C wurde die Genexpression durch Zugabe von Anhydrotetracyclin mit einer finalen Konzentration von 0,2 µg/ml induziert. Es folgte eine weitere Inkubation für 12 h bei 37 °C und 140 rpm im Schüttelinkubator. Anschließend erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation für 20 min bei 4000xg und 4 °C. Der

Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde zur Bestimmung der Biofeuchtmasse gewogen. Das Zellpellet wurde bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

3.2.1.4 Zellaufschluss von *E. coli*

Für die Reinigung der periplasmatisch hergestellten Fab-Fragmente wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Hierzu erfolgte die Resuspension des Zellpellets mit 3 ml Zellaufschlusspuffer (vgl. 2.2, S. 35) pro Gramm Biofeuchtmasse. Der Zellaufschluss via Ultraschall erfolgte eisgekühlt mittels dem Ultraschallgerät Sonifier[®] W-250 D (vgl. 2.11, S. 46) unter Verwendung folgender Parameter:

- 10 x 30 s Puls
- je 30 s Pause
- 30 % Amplitude

Durch eine anschließende Zentrifugation für 35 min bei 100000xg und 4°C wurden unlösliche Zellbestandteile abgetrennt. Mit dem Überstand (löslicher Zellextrakt), welcher das Zielprotein beinhaltete, wurden die weiteren Reinigungsschritte durchgeführt.

3.2.2 Kultivierung von *Pichia pastoris*

Folgend werden Methoden zur Herstellung, Anzucht und Haltung des methylotrophen Hefestammes *Pichia pastoris* X33 (*P. pastoris* X33, vgl. 2.4, S. 38) beschrieben, welcher in dieser Arbeit zur heterologen Herstellung von Proteinen verwendet wurde. Hierbei wird das für das Zielprotein codierende Gen stabil in das Genom von *P. pastoris* integriert, wobei dessen Transkription durch einen AOX1-Promotor kontrolliert wird. Für die genomische Integration des Zielgens wurde der Vektor pPICZ α A verwendet. Dieser besitzt eine Zeocin-Resistenzkassette, welche eine Selektion sowohl in *E. coli* als auch in *P. pastoris* ermöglicht. Desweiteren verfügt der Vektor über einen AOX1-Promotor mit *downstream* gelegener *multiple cloning site* sowie einem α -mating-Faktor aus *Saccharomyces cerevesiea*, welcher eine Sekretion des Zielproteins in den Kulturüberstand bedingt. Die genomische Integration des Vektors erfolgte nach Transformation von *P. pastoris* durch eine homologe Rekombination innerhalb des AOX1-Locus. Zu diesem Zweck erfolgte im Vorfeld eine Linearisierung der Plasmid-DNA durch die Restriktionsendonuklease SacI-HF, deren Schnittstelle innerhalb des AOX1-Promotors lokalisiert ist. Die Amplifikation sowie Präparation von pPICZ α A-Konstrukten erfolgte nach Klonierung des Zielgens in *E. coli*.

3.2.2.1 Herstellung elektrokompenter *P. pastoris*-Zellen

Die Herstellung elektrokompenter *P. pastoris* X33-Zellen erfolgte nach einem Protokoll von LIN-CEREGHINO *et al.*^[177] Diesem folgend wurde eine Vorkultur durch Inokulation von 20 ml YPD-Medium (vgl. 2.3, S. 37) mit einer Kolonie *P. pastoris* X33 angesetzt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 30 °C und 140 rpm. Mit dieser Vorkultur wurden 50 ml YPD-Medium beimpft, so dass die Start-OD₆₀₀ 0,2 betrug. Es folgte eine Inkubation für 4-6 h bei 30 °C und 140 rpm im Schüttelinkubator. Bei einer OD₆₀₀ von 1 erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation für 5 min bei 500xg und 20 °C. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 9 ml eiskaltem BEDS-Medium sowie 1 ml DTT-Stammlösung (vgl. 2.2, S. 35) resuspendiert, 5 min bei 30 °C und 100 rpm inkubiert und erneut für 5 min bei 500xg und 20 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl BEDS-Medium resuspendiert und zu je 50 µl aliquotiert. Die elektrokompenten *P. pastoris*-Zellen wurden direkt für eine Transformation mittels Elektroporation eingesetzt.

3.2.2.2 Transformation von *P. pastoris* mit Plasmid-DNA

Zu einem 50 µl Aliquot frisch präparierter elektrokompenter *P. pastoris*-Zellen wurden 50 ng linearisierte Plasmid-DNA gegeben und vorsichtig vermischt. Anschließend wurde der Transformationsansatz in eine vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette (vgl. 2.11, S. 46) überführt. Die Elektroporation wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

Spannung: 1500 V

Widerstand: 200 Ω

Kapazität: 25 µF

Nach erfolgter Transformation wurde der Ansatz in 0,5 ml Sorbitol (1,0 M) sowie 0,5 ml YPD-Medium aufgenommen und für 60 min bei 30 °C sowie 600 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf YPDS-Agarplatten (versetzt mit 100 µg/ml Zeocin) ausplattiert und für sechs Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.2.3 Anzucht und Stammhaltung von *P. pastoris*

Die Kultivierung von *P. pastoris* X33 zum Zweck der Herstellung rekombinanter Proteine erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in Schüttelkulturen bei 30 °C.

Die erfolgreiche Transformation von *P. pastoris* X33-Zellen mit dem gewünschten Plasmid wurde stets durch eine Kolonie-PCR verifiziert. Hierzu wurde die genomische DNA einer Einzelkolonie isoliert (vgl. 3.1.2, S. 50). Diese diente in einer anschließend durchgeführten analytischen PCR als *template*, wobei spezifische *primer* die Amplifikation des Zielgens ermöglichten. Für positiv getestete Kolonien erfolgte eine separate Kultivierung auf einer YPD-Agarplatte (versetzt mit 100 µg/ml Zeocin), welche für weitere Arbeiten für bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert wurde. Für eine Langzeitlagerung wurden 5 ml YPD-Medium mit einer entsprechenden Einzelkolonie beimpft und für 24 h bei 30 °C und 140 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Anschließend wurden 1 ml dieser Kultur mit 1 ml 86 %igem Glycerin vermischt und bei -80 °C als *glycerolstock* gelagert.

3.2.2.4 Rekombinante Herstellung von Trypsiligase-Varianten in *P. pastoris*

Die rekombinante Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Trypsiligase-Varianten erfolgte in dem *P. pastoris*-Stamm X33. Die Kulturen umfassten ein Kulturvolumen von 300 ml. Die Herstellung erfolgte hierbei in 3-l-Schüttelkolben ohne Schikane. In einem ersten Schritt wurde eine Vorkultur durch Inokulation von 50 ml BMD-Medium (vgl. 2.3, S. 37) mit einer Kolonie einer YPD-Agarplatte angesetzt. Es folgte eine Inkubation für 24 h bei 30 °C und 140 rpm im Schüttelinkubator. Nach einem darauf folgenden Zentrifugationsschritt für 20 min bei 4000xg und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 300 ml BM-Medium (vgl. 2.3, S. 37) resuspendiert sowie in einen 3-l-Schüttelkolben überführt. Nun erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 1 % (v/v) Methanol. Die Kultur wurde für 120 h bei 30 °C und 140 rpm im Schüttelinkubator inkubiert, wobei alle 24 h erneut 1 % (v/v) Methanol hinzugegeben wurde. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt für 20 min bei 4000xg und 4 °C. Das Zellpellet wurde verworfen. Der Kulturüberstand mit dem sekretierten Zielprotein wurde filtriert (0,45 µM Filter) und bis zu dessen Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Reinigung von Trypsiligase-Varianten

Für alle im Rahmen dieser Arbeit heterolog hergestellten Trypsiligase-Varianten wurde eine teilautomatisierte Zweischnitt-Reinigung an einem ÄKTAprime plus System durchgeführt. Da

alle Trypsiligase-Varianten *tag*-frei durch *P. pastoris* in den Kulturüberstand sekretiert wurden, bestand der erste Reinigungsschritt aus einer Kationenaustauschchromatographie. Diese ermöglichte die Isolation und Konzentration der Enzymvarianten. In einem zweiten Reinigungsschritt wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt, mit deren Hilfe die Zielproteine zur Homogenität gereinigt werden konnten.

3.3.1.1 Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie

Um eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen Zielprotein und negativ geladener Sulfopropyl-Sepharose zu gewährleisten, wurde zu dem filtrierten Kulturüberstand ein Volumenanteil Tn-Puffer A (vgl. 2.2, S. 35) mit einem pH-Wert von 4,0 hinzugegeben. Der isoelektrische Punkt aller Trypsiligase-Varianten liegt zwischen 4,8 bis 5,4, wodurch diese bei gegebenem pH-Wert eine positive Nettoladung aufwiesen. Für die Reinigung wurde der Kulturüberstand auf eine mit Tn-Puffer A äquilibrierte HiPrep™ SP FF 16/10-Säule (vgl. 2.11, S. 46) aufgetragen. Es folgte ein Waschschrift mit 5 CV (*column volume*) Tn-Puffer A. Anschließend erfolgte die Elution mit einem Stufengradienten von 0 auf 100 % Tn-Puffer B (vgl. 2.2, S. 35). Der Elutionspeak wurde in 2 ml-Fraktionen gesammelt und nach einer anschließenden Analyse mittels SDS-PAGE vereinigt. Nach Einengung des Gesamtvolumens auf 2 ml mittels eines Zentrifugalkonzentrators (Millipore Amicon Ultra-4; MWCO 10 kDa; vgl. 2.11, S. 46) wurde die Proteinprobe in einem zweiten Reinigungsschritt weiterverarbeitet. Die Flussgeschwindigkeit für Probenbeladung, Waschschrift und Elution betrug jeweils 10 ml/min.

3.3.1.2 Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie

Für den zweiten Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie wurde die Gel-filtrationssäule (HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 *prep grade*, vgl. 2.11, S. 46) mit 2 CV SEC-Laufpuffer (vgl. 2.2, S. 35) äquilibriert. Anschließend erfolgte die Auftragung von 2 ml Proteinprobe aus dem ersten Reinigungsschritt. Eluiert wurde mit SEC-Laufpuffer, wobei detektierte Proteinpeaks als 2 ml Fraktionen gesammelt wurden. Die Flussgeschwindigkeit für die Elution betrug 1,0 ml/min. Nach einer anschließenden Analyse der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE wurden Fraktionen, welche das zu reinigende Protein beinhalten, miteinander vereinigt. Es erfolgte die Konzentrierung des Zielproteins mittels Zentrifugalkonzentrator (Millipore Amicon Ultra-4; MWCO 10 kDa; vgl. 2.11, S. 46), sowie dessen Aliquotierung und Lagerung bei -20 °C.

3.3.2 Reinigung von Fab-Fragmenten

Für alle im Rahmen dieser Arbeit heterolog hergestellten Fab-Fragmente wurde eine teilautomatisierte Zweischnitt-Reinigung an einem ÄKTAprime plus System durchgeführt. Um das zu reinigende Fab-Fragment von den ebenfalls im Zellextrakt befindlichen, aus *E. coli* stammenden, löslichen Proteinbestandteilen abzutrennen, bestand der erste Reinigungsschritt aus einer Protein G-basierten Affinitätschromatographie. Hierbei bindet Protein G ein in der CH1-Domäne der schweren Kette lokalisiertes Epitop, wodurch eine spezifische Isolation und Konzentration der Fab-Fragmente ermöglicht wurde. In einem zweiten Reinigungsschritt wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt, mit deren Hilfe die entsprechenden Fab-Fragmente zur Homogenität gereinigt werden konnten.

3.3.2.1 Reinigung mittels Protein G-basierter Affinitätschromatographie

Für die Protein G-basierte Reinigung wurde der filtrierte lösliche Zellextrakt (vgl. 3.2.1.3, S. 55) auf eine mit Puffer A (vgl. 2.2, S. 35) äquilibrierte 1 ml HiTrap™ Protein G HP-Säule aufgetragen. Es folgte ein Waschschnitt mit 5 CV Puffer A. Anschließend erfolgte die Elution mit einem Stufengradienten von 0 auf 100 % Puffer B (vgl. 2.2, S. 35). Der Elutionspeak wurde in 0,3-ml Fraktionen gesammelt, zu denen sofort jeweils 0,05 ml Puffer C zur Neutralisation gegeben wurde. Da das Gesamtvolumen der vereinigten Fraktionen ca. 2 ml entsprach, konnte der zweite Reinigungsschritt direkt im Anschluss durchgeführt werden.

3.3.2.2 Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie

Die Reinigung der Fab-Fragmente mittels Größenausschlusschromatographie erfolgte analog zu der unter 3.3.1.2 beschriebenen Reinigung von Trypsinase-Varianten.

3.3.3 Reinigung von modifizierten Fab-Fragmenten

Alle im Rahmen dieser Arbeit modifizierten Fab-Fragmente wurden für eine nachfolgende Funktionalitätsanalyse chromatographisch über ein Einschnitt- oder Zweischnittverfahren gereinigt. Hierbei sollten der im Reaktionsansatz befindliche Biokatalysator, das nicht umgesetzte oder hydrolysierte Fab-Fragment sowie das entsprechende Nukleophil vollständig abgetrennt werden. Je nach artifizell eingeführter Funktionalität erfolgte die Reinigung mittels

hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) mit optional vorgelagerter Kationenaustauschchromatographie oder mittels einer Zweischrittreinigung, bestehend aus einer Protein G-basierten Affinitätschromatographie sowie nachfolgender Größenausschlusschromatographie (SEC).

3.3.3.1 Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie

Falls eine Trennung von Biokatalysator und modifiziertem Fab-Fragment mittels HIC-Reinigung nicht möglich war, wurde als vorgelagerter Reinigungsschritt eine Kationenaustauschchromatographie an einem ÄKTAprime plus System durchgeführt. Der verwendete Bindepuffer (Fab-Puffer A, vgl. 2.2, S. 35) besaß einen pH-Wert von 7,0. Hierbei konnte der Biokatalysator, dessen isoelektrischer Punkt (IP) bei pH 4,8 liegt, nicht an die negativ geladene Sulfopropyl-Sepharose der Kationenaustauschsäule (HiTrap™ SP HP 1 ml, vgl. 2.11, S. 46) binden. Mit einem IP von 8,3 waren die ebenfalls im Reaktionsansatz befindlichen Fab-Fragmentspezies in der Lage an die Sepharose zu binden.

Für die Reinigung wurde der Reaktionsansatz mit neun Volumenanteilen Fab-Puffer A versetzt und anschließend auf die mit Fab-Puffer A äquilibrierte 1 ml HiTrap SP-HP-Säule aufgetragen. Es folgten zwei Waschschriffe mit 2 CV Fab-Puffer A und 5 CV Fab-Puffer B (vgl. 2.2, S. 35). Anschließend erfolgte die Elution des Fab-Fragmentes mit einem Stufengradienten von 10 auf 100 % Fab-Puffer B. Der Elutionspeak wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt und nach einer anschließenden Analyse mittels SDS-PAGE vereinigt. Nach Einengung des Gesamtvolumens auf ca. 0,1 ml mittels Zentrifugalkonzentrator (Millipore Amicon Ultra-4; MWCO 10 kDa; vgl. 2.11, S. 46), wurde die Proteinprobe in einem zweiten Reinigungsschritt weiterverarbeitet. Die Flussgeschwindigkeit für Probenbeladung, Waschschriff und Elution betrug jeweils 1 ml/min.

3.3.3.2 Reinigung mittels hydrophober Interaktionschromatographie

Die Reinigung der modifizierten Fab-Fragmente erfolgte bei Einschriffreinigung an einem Breeze™-HPLC-System mit einer TSKgel Butyl-NPR-Säule (vgl. 2.11, S. 46). Wurde die hydrophobe Interaktionschromatographie als zweiter Reinigungsschriff mit vorgelagerter Kationenaustauschchromatographie durchgeführt, erfolgte die Reinigung an einem ÄKTAprime plus System mit einer 1 ml HiTrap™ Butyl HP-Säule.

Für die Reinigung wurde der Reaktionsansatz bzw. die Proteinfraction der Kationenaustauschchromatographie mit neun Volumenanteilen HIC-Puffer A (vgl. 2.2, S. 35) versetzt und

anschließend auf die mit HIC-Puffer A äquilibrierte HIC-Säule aufgetragen. Es folgte ein Waschschrift mit 2 CV HIC-Puffer A. Anschließend erfolgte die Elution der Fab-Fragmentspezies mit einem linearen Gradienten von 0 auf 100 % HIC-Puffer B (vgl. 2.2, S. 35) über 15-20 CV. Der Elutionspeak wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt und nach einer anschließenden Analyse mittels SDS-PAGE vereinigt. Es folgte ein Pufferaustausch gegen HIC-Puffer C (vgl. 2.2, S. 35) sowie eine Konzentrierung der Proteinprobe mittels Zentrifugalkonzentrator (Millipore Amicon Ultra-4; MWCO 10 kDa; vgl. 2.11, S. 46). Die Identität des zur Homogenität gereinigten Fab-Fragmentes wurde massenspektrometrisch überprüft. Die gereinigten Fragmente wurden direkt in Folgeexperimenten eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Flussgeschwindigkeit für Probenbeladung, Waschschrift und Elution betrug für die Reinigung am Breeze™-HPLC-System 0,5 ml/min und am ÄKTAprime plus System 1 ml/min.

3.3.3.3 Reinigung mittels Protein G-basierter Affinitätschromatographie

Für die Reinigung wurde der Reaktionsansatz mit neun Volumenanteilen Puffer A (vgl. 2.2, S. 35) versetzt und anschließend auf die mit Puffer A äquilibrierte 1 ml HiTrap™ Protein G HP-Säule aufgetragen. Es folgte ein Waschschrift mit 5 CV Puffer A. Anschließend erfolgte die Elution mit einem Stufengradienten von 0 auf 100 % Puffer B (vgl. 2.2, S. 35). Der Elutionspeak wurde in 0,5 ml Fractionen gesammelt, zu denen sofort jeweils 0,08 ml Puffer C (vgl. 2.2, S. 35) zur Neutralisation gegeben wurde. Nach Einengung des Gesamtvolumens auf ca. 0,25 ml mittels Zentrifugalkonzentrator (Millipore Amicon Ultra-4; MWCO 10 kDa; vgl. 2.11, S. 46), wurde die Proteinprobe in einem zweiten Reinigungsschritt weiterverarbeitet. Die Flussgeschwindigkeit für Probenbeladung, Waschschrift und Elution betrug jeweils 1 ml/min.

3.3.3.4 Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie

Für den zweiten Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie wurde die Gel-filtrationssäule (Superose® 12 10/300 GL, vgl. 2.11, S. 46) mit SEC-Laufpuffer (vgl. 2.2, S. 35) äquilibriert. Anschließend erfolgte die Auftragung von 0,25 ml Proteinprobe aus dem ersten Reinigungsschritt. Eluiert wurde mit SEC-Laufpuffer, wobei detektierte Proteinpeaks als 0,5-ml Fractionen gesammelt wurden. Nach einer Analyse der einzelnen Fractionen mittels SDS-PAGE wurden Fractionen, welche das zu reinigende Protein beinhalten, vereinigt. Es erfolgte die Konzentrierung des Zielproteins mittels Zentrifugalkonzentrator

(Millipore Amicon Ultra-4; MWCO 10 kDa; vgl. 2.11, S. 46). Die gereinigten Fragmente wurden direkt in Folgeexperimenten eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Flussgeschwindigkeit für die Beladung sowie Elution betrug 0,2 ml/min.

3.3.4 Proteinanalytik

3.3.4.1 Konzentrationsbestimmung mittels UV/VIS-Spektroskopie

Die Konzentrationsbestimmung für wässrige Proteinlösungen erfolgte mittels der UV/VIS-Spektroskopie. Hierbei wurde die Extinktion in einem Spektralbereich von 220 nm bis 400 nm gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte mittels der pufferkorrigierten Extinktion bei 280 nm unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes:

$$E_{280-320} = \epsilon_{280} * c * d \quad (\text{Gl. 2})$$

$E_{280-320}$	= Extinktion bei 280 nm korrigiert um die Extinktion bei 320 nm
ϵ_{280}	= molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm in l/(mol * cm)
c	= Konzentration der Proteinlösung in mol/l
d	= Schichtdicke der Küvette in cm

Der molare Extinktionskoeffizient eines Proteins bei 280 nm wurde mit Hilfe des Programms ProtParam (vgl. 2.12, S. 49) aus dessen Aminosäuresequenz abgeschätzt.^[178] Anhand des Verhältnisses der Extinktionen bei 280 nm zu 260 nm konnte eine Verunreinigung der Proteinlösung mit Nukleinsäuren abgeschätzt werden.

3.3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse von Proteinen sowie Proteingemischen erfolgte unter anderem durch gelelektrophoretische Trennung mittels SDS-PAGE.^[179] Hierzu wurden 15 % ige SDS-Gele verwendet, deren Zusammensetzung in Tabelle 17 aufgeführt sind.

Tabelle 17: Zutaten für die Herstellung von vier 15 % igen SDS-Gelen.

Chemikalie	Trenngel (15 %)	Sammelgel (7,5 %)
ddH ₂ O (ml)	7,2	4,9

Methoden

Trenngelpuffer (ml)	7,5	-
Sammelgelpuffer (ml)	-	2,5
Rotiphorese® Gel 30 (µl)	15	2,5
10 % SDS Stammlösung (µl)	300	100
10 % APS Stammlösung (µl)	150	50
TEMED (µl)	15	5

Zur Abschätzung des apparenten Molekulargewichtes wurde auf jedem Gel der Proteinstandard PageRuler™ Unstained Protein Ladder (vgl. 0, S. 46) aufgetragen. Die Proteinproben wurden mit 1/3 Volumenanteil 3 x SDS-Probenpuffer (vgl. 2.2, S.35) versetzt, 10 min bei 95 °C im Thermoblock inkubiert und anschließend auf das entsprechende Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V für 40-45 min in 1 x SDS-Laufpuffer (vgl. 2.2, S. 35). Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde standardmäßig eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Hierzu wurden die Polyacrylamid-Gele zunächst für 3 x 5 min in entionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 h in Coomassie-Farbelösung (vgl. 2.2, S. 35), wobei der darin enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 unspezifisch an basische Aminosäureseitenketten von Proteinen bindet. Zur Kontrastierung der Proteinbanden wurde ungebundener Coomassie-Farbstoff durch mehrmaliges Waschen mit Entfärberlösung (vgl. 2.2, S. 35) entfernt.

Zur Visualisierung von Proteinen mit geringer Konzentration wurde eine Silberfärbung nach NESTERENKO durchgeführt.^[180] Die einzelnen Teilschritte zur Durchführung sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Durchführung der Silberfärbung nach NESTERENKO. Die Zusammensetzung der Lösungen ist Kapitel 2.2 auf Seite 35 zu entnehmen. Das Volumen der verwendeten Lösungen beträgt jeweils 60 ml.

Teilschritt	Lösung	Inkubationsdauer
Fixieren	Fixierlösung	5 min
Spülen	ddH ₂ O	3 x 5 s
Waschen	ddH ₂ O	5 min
Spülen	ddH ₂ O	3 x 5 s
VorbehandlungI	VorbehandlungslösungI	5 min
VorbehandlungII	VorbehandlungslösungII	1 min
Spülen	ddH ₂ O	3 x 5 s
Imprägnieren	Imprägnierlösung	8 min
Spülen	ddH ₂ O	2 x 5 s
Entwickeln	Entwicklerlösung	10-20 s
Abstoppen	Stopplösung	30 s
Spülen	ddH ₂ O	10 s

3.3.4.3 *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurde ein *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* durchgeführt. Dieser erfolgte standardmäßig im 96-*well*-Mikrotiterplattenformat. Für die zur Detektion verwendete enzymatische Farbreaktion wurden ausschließlich POD-konjugierte Antikörper eingesetzt. Insofern das Zielprotein biotinyliert vorlag, erfolgte dessen Immobilisierung auf einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte (MTP) der Firma Pierce (vgl. 2.11, S. 46). Bei nicht biotinylierten Zielproteinen erfolgte eine unspezifische Immobilisierung durch Adsorption, wobei die 96-*well*-Mikrotiterplatten Nunc Maxisorp verwendet wurden.

Generell wurden 100-1000 ng Zielprotein (in 50-100 μl TBS; vgl. 2.2, S. 35) je Kavität über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Im Falle der Immobilisierung durch Adsorption erfolgte nach dreimaligem Waschen mit 300 $\mu\text{l/well}$ TBST0,05 (vgl. 2.2, S. 35) das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 300 $\mu\text{l/well}$ 1 x *blocking*-Puffer (vgl. 2.2, S. 35) für 2 h bei Raumtemperatur. Bei Verwendung einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte erfolgte die Entfernung von überschüssigem biotinylierten Zielprotein durch dreimaliges Waschen mit 300 $\mu\text{l/well}$ TBST0,05. Nach jedem nun folgenden Inkubationsschritt wurde ein Waschschriff mit 3 x 300 $\mu\text{l/well}$ TBST0,05 durchgeführt. Folgend wurden 50 $\mu\text{l/well}$ des zu testenden Liganden (in TBST0,05 verdünnt) hinzugegeben, welcher für 1 h bei Raumtemperatur mit dem immobilisierten Zielprotein inkubiert wurde. Es folgte eine Inkubation mit 50 $\mu\text{l/well}$ primärem Antikörper (vgl. 2.9, S. 44; Verdünnung entsprechend der Herstellerangabe in TBST0,05) für 1 h bei Raumtemperatur. Im Falle eines direkten *ELISA* war der primäre Antikörper POD-konjugiert. Hier erfolgte nach einem zusätzlichen Waschschriff mit 3 x 300 $\mu\text{l/well}$ TBS die Inkubation mit 50 $\mu\text{l/well}$ TMB-Substrat (TMB One, vgl. 2.1, S. 33), wobei die Farbreaktion nach 5-30 min mit 50 $\mu\text{l/well}$ 0,5 M H_2SO_4 abgestoppt wurde. Im Falle eines indirekten *ELISA* wurde ein zusätzlicher Inkubationsschriff mit einem sekundären POD-konjugierten Antikörper durchgeführt. Abschließend wurde die Extinktion bei 450 nm mittels Biomek™ Paradigm Reader (vgl. 2.11, S. 46) gemessen und um den Wert bei 620 nm korrigiert. Sollte die Bindungsaffinität eines Liganden zur immobilisierten Zielstruktur analysiert werden, wurde ein konzentrationsabhängiger *ELISA* durchgeführt. Hierbei wird die immobilisierte Zielstruktur mit einer seriellen Verdünnung eines Liganden inkubiert. Die weitere Durchführung des *ELISA*'s entspricht der oben beschriebenen Vorgehensweise. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante werden die erhaltenen Signalintensitäten gegen die logarithmierten Ligandenkonzentrationen aufgetragen. Anschließend erfolgt eine nichtlineare Regressionsanalyse mittels Gleichung 3.

$$y = y_0 + \frac{a - y_0}{1 + e^{-\frac{x - x_0}{b}}} \quad (\text{Gl. 3})$$

y_0	= untere Asymptote
a	= obere Asymptote
b	= Steigung der Kurve
x_0	= Wendepunkt

Die Dissoziationskonstante ergibt sich aus dem delogarithmierten Wert des Wendepunktes x_0 . Dieser entspricht jener jener Ligandenkonzentration, bei der die Signalintensität ihren halbmaximalen Wert erreicht.

3.4 Phagen-Display

Für die Generierung von Trypsiligase-Varianten mit verbesserten Syntheseigenschaften hinsichtlich der C-terminalen Modifikation von Proteinen wurde das Phagen-Display als evolutionäres Selektionssystem eingesetzt. Hierbei werden Proteinvarianten (Phänotyp) einer Trypsiligasebibliothek monovalent auf der Oberfläche des filamentösen Bakteriophagens M13 präsentiert, wobei die genetische Information (Genotyp) der entsprechenden Trypsiligase-Variante Phagemid-lokalisiert im Inneren des Phagen verpackt ist (Abb. 5A, S. 30). Wie in Abbildung 55B (S. 30) gezeigt, erlaubt diese Phänotyp-Genotyp-Kopplung eine gezielte Selektion von potentiell verbesserten Biokatalysatoren. Hierbei wird ein N-terminal biotinyliertes Peptidsubstrat (Abb. 5C, S. 30), welches mit der Erkennungssequenz von Trypsiligase (YRH) ausgestattet ist, auf einer Streptavidin-beschichteten Oberfläche immobilisiert. Es folgt ein Inkubationsschritt mit einer Trypsiligase-basierten Phagen-Bibliothek. Nach Einbindung des Substrates im aktiven Zentrum kommt es zur Ausbildung von kovalent verknüpften Acyl-Enzym-Phagen-Intermediaten. Nicht gebundene oder schnell hydrolysierende Trypsiligase-Varianten werden durch mehrere Waschschrte entfernt. Die Zugabe eines Peptidnukleophils bedingt die Elution der gebundenen Phagen durch eine Deacylierung des Acyl-Enzym-Phagen-Komplexes via Aminolyse. Zur Amplifikation der eluierten Phagen werden *E. coli*-Zellen infiziert. Durch eine anschließende Superinfektion mit einem Helferphagen wird ein neuer Phagenpool mit angereicherten Trypsiligase-Varianten propagiert. Dieser kann weiteren Selektionsrunden unterzogen werden, wobei der Selektionsdruck von Runde zu Runde erhöht wird. Schließlich wird der Pool von Trypsiligase-Varianten der letzten

Selektionsrunde in einem Hochdurchsatz-Screening nach potentiell verbesserten Biokatalysatoren durchgemustert.

3.4.1 Konstruktion eines Phagemidvektors

Als *template* für die Konstruktion eines Phagemidvektors wurde der Vektor pASK-IBA7plus verwendet (Abb. 6A). Bei der Konstruktion des Phagemidvektors wurde der 5'-UTR Bereich zwischen der XbaI-Schnittstelle und dem Startcodon der pelB-Signalsequenz in Analogie zu den Phagemidvektoren der pCD-Serie gestaltet.^[181]

Die für das Phagen-Display benötigte Genkassette, welche für ein Fusionsprotein bestehend aus pelB-Signalsequenz, Trypsiligase, einem flexiblen Linker sowie der C-terminalen Domäne des Phagenhüllproteins pIII (AS 252-406) codiert, wurde PCR-basiert aus dem Vektor pSCIL-PhD10_4Tn (vgl. 2.6, S. 39) amplifiziert. Hierzu wurden die *primer* pASK-fwd und pASK-rev (Tab. 10, S. 42) verwendet. Über die durch die *primer* eingeführten XbaI- und HindIII-Schnittstellen erfolgte die Klonierung der amplifizierten Genkassette in den Vektor pASK-IBA7plus. Im Zuge der Optimierung des Phagen-Displays wurde die Gensequenz für Trypsiligase, welche nicht auf die *codon usage* von *E. coli* angepasst war, durch eine *codon usage*-optimierte Gensequenz ausgetauscht. Eine entsprechend optimierte Gensequenz wurde von der Firma Life Technologies synthetisiert. Der Austausch des Gens erfolgte über zwei nicht identische SfiI-Schnittstellen, welche die codierende Sequenz von Trypsiligase sowohl innerhalb der Phagemid-lokalisierten Genkassette als auch im synthetisierten Gen flankieren. Hieraus resultierte der Vektor pMB-03_4Tn. Desweiteren wurde für die Generierung der Phagemid-lokalisierten Trypsiligasebibliothek der Vektor pMB-03_sfGFP konstruiert, bei welchem die Gensequenz von Trypsiligase gegen die des *superfolder green fluorescent protein* (sfGFP) ausgetauscht wurde.^[182] Die PCR-basierte Amplifizierung des sfGFP Gens erfolgte mittels der *primer* sfGFP_SfiI_fwd und sfGFP_SfiI_rev aus dem Vektor pETSoSc1_sfGFP als *template*. Über die artifiziell eingefügten SfiI-Schnittstellen erfolgte der Austausch der Gensequenz für Trypsiligase gegen die von sfGFP.

Für den Austausch der im pMB-03 vorhandenen MyCUT Sequenz innerhalb der flexiblen Linkerregion durch eine Wildtyp pIII-Linker Sequenz (AS 233-246; Abb. 6C) wurde das *codon usage* angepasste Gen von Trypsiligase mit dem *primer*-Paar SF_fwd und EF_fwd mittels PCR amplifiziert.^[183] Über die eingeführte NcoI- sowie BamHI-Schnittstelle wurde das PCR-Produkt in den Vektor pMB-03 kloniert. Hieraus resultierte der Vektor pMB-04_4Tn.

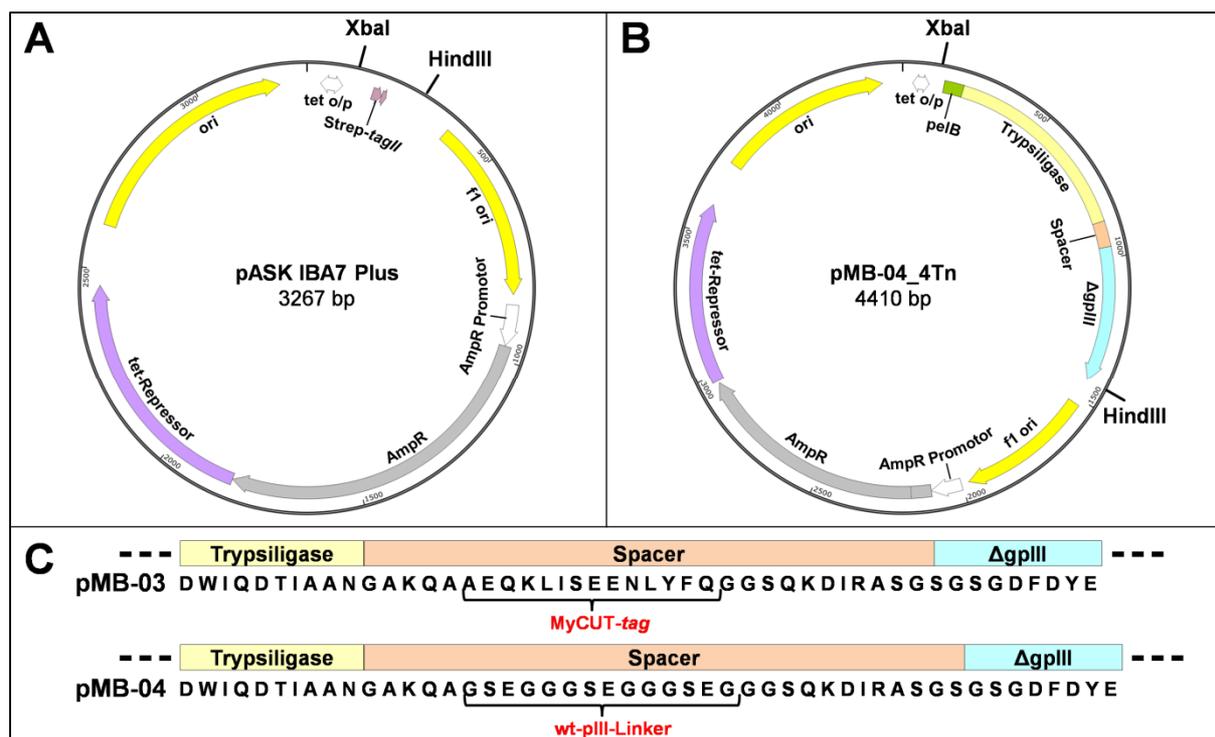


Abbildung 6: Übersicht zur Konstruktion eines Phagemidvektors. **A)** Plasmidkarte für den Vektor pASK-IBA7plus mit Darstellung der Restriktionsschnittstellen XbaI und HindIII. **B)** Plasmidkarte des Phagemidvektors pMB-04_4Tn mit inserierter Genkassette, welche für ein Fusionspeptid bestehend aus pelB-Signalsequenz, Trypsiligase, einem flexiblen Spacer sowie der C-terminalen Domäne des Phagenhüllproteins pIII (AS 252-406) codiert. **C)** Aminosäuresequenzen der flexiblen Spacer, welche durch pMB-03 sowie pMB-04 codiert werden.

3.4.2 Erstellung einer Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek

Für die Konstruktion einer Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek wurde ein modulares Design verwendet, welches in der Arbeitsgruppe "Künstliche Bindeproteine" (MLU Halle-Wittenberg) etabliert wurde. Dieses vereint die Verwendung einer Trinukleotid-basierten Randomisierungsstrategie^[184] mit der Durchführung einer Leserahmenselektion^[185] für einzelne Genfragmente.

In Abbildung 7A ist das modulare Design der Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek schematisch dargestellt. Hierbei wird das für Trypsiligase codierende Gen in acht Fragmente (vier konstante und vier randomisierte) unterteilt. Mit diesen Fragmenten wurde zur Erhöhung der Funktionalität eine Leserahmenselektion durchgeführt. Diese basiert auf einer Transformation von *E. coli*-Zellen mit dem Vektor pInSALect_NWG-1, welcher freundlicherweise von Herrn Dr. Sven Pfeifer (AG Künstliche Bindeproteine) zur Verfügung gestellt wurde. Der pInSALect-Vektor verfügt über ein Plasmid-lokalisiertes Reportergen, welches eine transiente Ampicillinresistenz vermittelt. Hierbei codiert das Reportergen für ein Propeptid, welches aus einem Tat-Signalpeptid, einem VMA-Intein sowie einer β -Lactamase besteht. Durch ein posttranslationales Intein-vermitteltes cis-Spleißen wird die β -Lactamase mit dem Tat-

Signalpeptid fusioniert und anschließend ins Periplasma transportiert. Dieser periplasmatische Export stellt einen essentiellen Schritt für die Vermittlung der Ampicillinresistenz dar.^[185]

Innerhalb der Gensequenz des VMA-Inteins befinden sich eine AgeI- sowie MluI-Schnittstelle, welche die Insertion von DNA-Fragmenten ermöglichen. Wird hierbei ein DNA-Fragment inseriert, welches eine Leserahmenverschiebung innerhalb des Reportergens bedingt, führt dies zur unvollständigen Translation des Propeptides und damit zur fehlenden Ampicillinresistenz. DNA-Fragmente mit korrektem Leserahmen führen folglich zu korrekt translatiertem Propeptid, wodurch wiederum eine Selektion entsprechend transformierter *E. coli*-Zellen auf Ampicillin bzw. Carbenicillin-haltigen LB-Agarplatten möglich ist. Da das Translationsprodukt des inserierten DNA-Fragmentes zusammen mit dem Intein durch das cis-Spleißen entfernt wird, ergeben sich hierdurch keine unerwünschten Nebeneffekte hinsichtlich der Selektion von DNA-Fragmenten mit korrektem Leserahmen.

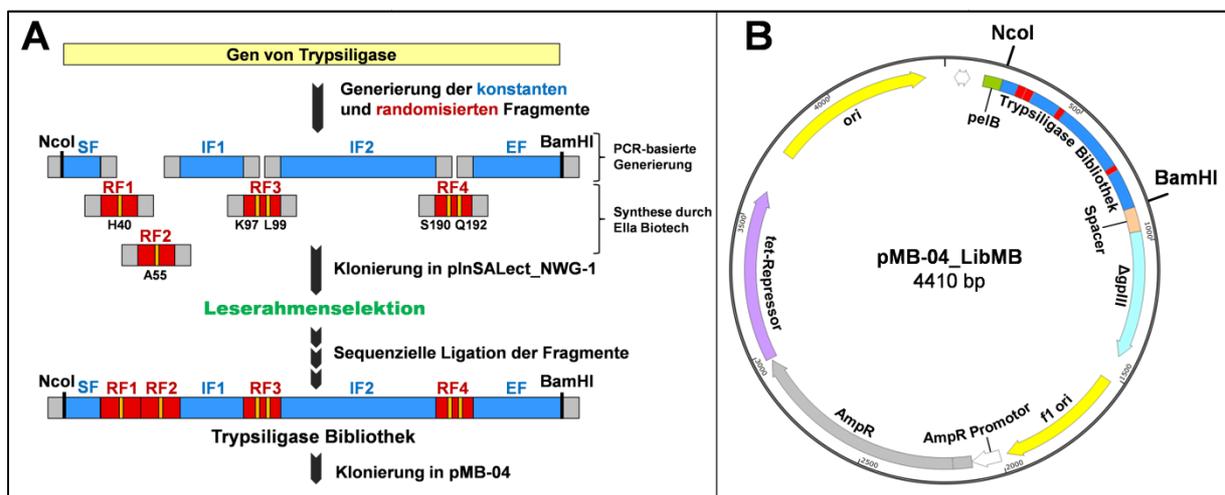


Abbildung 7: Generierung einer Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek. A) Schematische Darstellung zum modularen Bibliotheksdesign sowie zum Ablauf der Konstruktion der DNA-Bibliothek. SF: Startfragment; EF: Endfragment; IF: Intermediäres Fragment; RF: Randomisiertes Fragment B) Vektorkarte für den Phagemid pMB-04_LibMB mit inserierter Trypsiligase-Bibliothek. Die Insertion der DNA-Bibliothek erfolgt über die Restriktionsschnittstellen NcoI sowie BamHI.

Die Generierung der konstanten Fragmente erfolgte PCR-basiert mit den in Tabelle 19 aufgeführten *primer*-Paaren wie unter 3.1.3 (S. 50) beschrieben. Das hierfür notwendige Gen von Trypsiligase wurde von der Firma Life Technologies synthetisiert, wobei die Gensequenz für eine Expression in *E. coli* optimiert wurde (vgl. Abb. A9, S. 181). Über die jeweiligen *forward-primer* werden im 5'-Bereich eine AgeI- sowie BsaI-Schnittstelle eingeführt und über die *reverse-primer* werden im 3'-Bereich eine BsmBI-sowie MluI-Schnittstelle eingeführt. Hierbei dienen die AgeI- und MluI-Schnittstellen zur Insertion der Fragmente in Vektor pInSAlect_NWG-1. Über die beiden Typ IIS Restriktionsschnittstellen BsaI und BsmBI erfolgt die sequenzielle Reassemblierung der Einzelfragmente, ohne hierbei artifizielle Sequen-

zen im Ligationsprodukt einzuführen. Die mittels PCR amplifizierte konstanten Fragmente (Tab. 19, S. 71) wurden durch eine präparative Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 3.1.4, S. 51) gereinigt. Anschließend wurden für die Durchführung einer Leserahmenselektion jeweils 7,5 pmol gereinigtes Fragment sowie 2,5 pmol pInSAlect_NWG-1 mittels AgeI-HF und MluI verdaut (vgl. 3.1.6, S. 52). Es folgte eine Reinigung mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese. Nun erfolgte die Insertion der geschnittenen konstanten Fragmente in den pInSAlect-NWG-1 Vektor mittels DNA-Ligation (vgl. 3.1.7, S. 52). Hierbei wurden jeweils 300 pmol Fragment sowie 50 pmol Vektor eingesetzt. Anschließend erfolgte die Transformation von elektrokompenten *E. coli* ElektroTen-Blue mittels Elektroporation (vgl. 3.2.1.1, S. 54), wobei 1 µl des Ligationsansatzes eingesetzt wurde. Der Ausstrich der Transformationsansätze erfolgte auf LB-Agarplatten (versetzt mit 50 µg/ml Carbenicillin). Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C wurde für jedes Leserahmen-selektierte konstante Fragment eine Flüssigkultur angesetzt. Dies erfolgte durch Inokulation von 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie. Nach einer Inkubation für 24 h bei 30 °C wurde eine Plasmidpräparation (vgl. 3.1.1, S. 50) durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die randomisierten Fragmente wurden synthetisch durch die Firma Ella Biotech GmbH als einzelsträngige Oligonukleotide hergestellt. Ebenso wie die konstanten Fragmente wurden die randomisierten Fragmente im 5'- und 3'-Bereich mit BsaI/AgeI-Schnittstellen, respektive BsmBI/MluI-Schnittstellen, versehen. Die Randomisierung auf DNA-Ebene erfolgte durch eine Trinukleotid-basierte Synthesestrategie durch Verwendung einer definierten Mischung von Trinukleotid-Phosphoramiditen bei zu randomisierenden Aminosäurepositionen. Für die Generierung der doppelsträngigen randomisierten Fragmente wurden die korrespondierenden einzelsträngigen Oligonukleotide zunächst am 3'-Ende mit dem *reverse primer* 4Tnlib_RF_anti (Tab. 10, S.42) hybridisiert. Hierzu wurden je 50 pmol einzelsträngiges Oligonukleotid sowie 4Tnlib_RF_anti in einem Gesamtvolumen von 35 µl für 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend mit 0,02 K/s auf 25 °C abgekühlt. Der durch die Hybridisierung entstandene 5'-Überhang wurde in einem nachfolgenden Schritt durch das Klenow-Fragment (NEB) zum Doppelstrang aufgefüllt. Hierzu wurden zum Hybridisierungsansatz 5 µl CutSmart®-Puffer, 1 µl dNTP's (je 10 mM) sowie 2 µl (10 U) Klenow-Fragment hinzugegeben. Nach einer Inkubation für 15 min bei 25 °C erfolgte die Inaktivierung des Klenow-Fragmentes für 30 min bei 75 °C. Zur Durchführung der Leserahmenselektion wurden die nun doppelsträngigen randomisierten Fragmente direkt mittels AgeI-HF sowie MluI verdaut und durch eine präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Die Insertion in den Vektor

pInSAlect-NWG-1 sowie die anschließende Leserahmenselektion erfolgten analog zu der für die konstanten Fragmente beschriebenen Vorgehensweise.

Schließlich wurden sowohl die konstanten als auch die randomisierten Fragmente PCR-basiert (Tab. 19, S. 69) amplifiziert, wobei die korrespondierenden pInSAlect-Konstrukte als *template* dienten. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt.

Tabelle 19: Zusammenfassung der PCR-Bedingungen für die Konstruktion der Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek.

PCR Produkt	<i>forward primer</i>	<i>reverse primer</i>	Hybridierungstemperatur
Generierung der konstanten Fragmente:			
SF	SF_fwd	SF_rev	50 °C
IF1	IF1_fwd	IF1_rev	50 °C
IF2	IF2_fwd	IF2_rev	50 °C
EF	EF_fwd	EF_rev	50 °C
Amplifikation aus pInSAlect	Midlibs_fwd	Midlibs_rev	63 °C
Amplifikation der Ligationsprodukte	Midlibs_fwd	Midlibs_rev	63 °C

Nun erfolgte die sequenzielle Reassemblierung der selektierten Einzelfragmente zur vollständigen DNA-Bibliothek über drei Ligationsrunden, welche detailliert in Tabelle 20 (S. 73) zusammengefasst sind. Dabei umfasste eine Ligationsrunde die Arbeitsschritte Restriktionsverdau, Fragmentligation und PCR-basierte Amplifikation des Ligationsproduktes. Der Restriktionsverdau der entsprechenden Fragmente erfolgte durch einen Doppelverdau mittels BsaI/ScaI oder BsmBI/BssSI (vgl. 3.1.6, S. 52). Hierbei dienten ScaI bzw. BssSI dem Verdau des unerwünschten Fragmentes, welches beim Restriktionsverdau mit BsaI bzw. BsmBI entstand. Dies erlaubte eine genauere Präparation des gewünschten Fragmentes in der sich anschließenden Agarose-Gelelektrophorese. Der Ligationsschritt erfolgte mit den in Tabelle 20 (S. 73) gezeigten Fragmentpaarungen.

Hierzu wurden je 500 fmol der Fragmente eingesetzt, wobei die Ligation mittels T4-Ligase für 12 h bei 16 °C erfolgte. Die Ligationsprodukte wurden anschließend PCR-basiert (Tab. 19, S. 69) amplifiziert und mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Das amplifizierte PCR-Produkt der 3. Ligationsrunde, welches der finalen DNA-Bibliothek entsprach, wurde schließlich in den Phagemidvektor pMB-04 kloniert. Dabzu wurden die Trypsiligase-basierte Bibliothek sowie der Vektor pMB-03_sfGFP (vgl. 3.4.1, S. 67) mittels NcoI und

BamHI verdaut. Nach einer Reinigung via Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Ligation, wobei 600 fmol Vektor und 1800 fmol Insert eingesetzt wurden. Hieraus resultierte die Phagemid-lokalisierte DNA-Bibliothek pMB-04_LibMB (Abb. 6B, S. 69).

Nun erfolgte zum Zweck der Phagenpropagierung die Transformation von *E. coli*-Zellen mit pMB-04_LibMB. Hierzu wurde mit dem Ligationsansatz zunächst eine Ethanolfällung durchgeführt. Da für Transformationen mit Plasmid-DNA aus Ligationsansätzen generell niedrigere Transformationseffizienzen als mit präparierter Plasmid-DNA erzielt werden, wurde die DNA-Bibliothek zunächst in elektrokompetente *E. coli* NEB-10beta (vgl. 2.4, S. 38) transformiert. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine sehr hohe Transformationseffizienz von $2 \cdot 10^{10}$ cfu/ μ g pUC19 aus und eignet sich zudem aufgrund der Eliminierung von Endonuklease I (*endA*) für die Isolation von Plasmid-DNA. Für die Transformation mittels Elektroporation (vgl. 3.2.1.1, S. 54) wurden insgesamt 1,5 μ g (entspricht 515 fmol) der ligierten DNA-Bibliothek eingesetzt, wobei je 50 μ l Aliquot *E. coli*-Zellen 100 ng (entspricht 35 fmol) ligierter Vektor verwendet wurden. Nach erfolgter Transformation wurden die Ansätze in jeweils 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium aufgenommen und für 45 min bei 37 °C und 700 rpm im Thermomixer geschüttelt. Anschließend wurden die Transformationsansätze vereint und in 900 ml LB-Medium (versetzt mit 100 μ g/ml Carbenicillin) überführt. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,0 erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation für 15 min bei 4000xg und 4 °C. Anschließend erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA, wie unter 3.1.1 (S. 50) beschrieben. Nun wurden die für das Phagen-Display verwendete *E. coli*-Zellen ER2738 (vgl. 2.4, S. 38) mit der Phagemid-lokalisierten DNA-Bibliothek pMB-04_LibMB transformiert. Für die Transformation mittels Elektroporation wurden insgesamt 60 ng (entspricht 21 fmol) der DNA-Bibliothek eingesetzt, wobei je 25 μ l Aliquot von *E. coli*-Zellen 10 ng (entspricht 3,5 fmol) Vektor eingesetzt wurden. Anschließend wurden die Transformationsansätze auf sechs Q-Tray Platten mit 2xYT-Agar (versetzt mit 100 μ g/ml Carbenicillin) ausplattiert und für 12 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte das Abschwemmen der gewachsenen *E. coli* Kolonien mit 6 ml 2xYT-Medium je Q-Tray Platte. Die vereinigte Zellsuspension wurde mit Glycerol (Endkonzentration 25 % (v/v)) versetzt und zu jeweils 1,5 ml aliquotiert. Nach Bestimmung der optischen Dichte (OD₆₀₀) wurden die Aliquote in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 20: Übersicht zur sequenziellen Konstruktion der Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek. SF: Startfragment; EF: Endfragment; IF: Intermediäres Fragment; RF: Randomisiertes Fragment.

	SF	RF1	RF2	IF1	RF3	IF2	RF4	EF	
Größe des Fragments [bp]	99	72	72	141	66	294	63	249	Leserahmen- selektion
Größe nach <i>AgeI/MluI</i> Verdau [bp]	$\frac{81}{7}$ 11	$\frac{48}{10}$ 14	$\frac{48}{10}$ 14	$\frac{123}{7}$ 11	$\frac{42}{10}$ 14	$\frac{276}{7}$ 11	$\frac{39}{10}$ 14	$\frac{231}{7}$ 11	
Amplifikation aus pInSAlect [bp]	627	594	594	669	588	822	585	777	
Größe nach <i>BsaI/Scal</i> sowie <i>BsmBI/BssSI</i> Verdau [bp]	$\frac{368}{103}$ 156	$\frac{289}{93}$ 212	$\frac{335}{103}$ 156	$\frac{364}{93}$ 212	$\frac{329}{103}$ 156	$\frac{517}{93}$ 212	$\frac{326}{103}$ 156	$\frac{472}{93}$ 212	1. Ligationrunde
Fragmentpaarung für Ligation	SF + RF1 ↓ SF-RF1		RF2 + IF1 ↓ RF2-IF1		RF3 + IF2 ↓ RF3-IF2		RF4 + EF ↓ RF4-EF		
Größe des Ligationsproduktes [bp]	657		699		846		798		
Größe nach <i>BsaI/Scal</i> sowie <i>BsmBI/BssSI</i> Verdau [bp]	$\frac{398}{103}$ 156		$\frac{394}{93}$ 212		$\frac{587}{103}$ 156		$\frac{493}{93}$ 212		
Fragmentpaarung für Ligation	SF-RF1 + RF2-IF1 ↓ SF-RF1-RF2-IF1				RF3-IF2 + RF4-EF ↓ RF3-IF2-RF4-EF				2. Ligationrunde
Größe des Ligationsproduktes [bp]	792				1080				
Größe nach <i>BsaI/Scal</i> sowie <i>BsmBI/BssSI</i> Verdau [bp]	$\frac{533}{103}$ 156				$\frac{775}{93}$ 212				
Fragmentpaarung für Ligation	SF-RF1-RF2-IF1 + RF3-IF2-RF4-EF ↓ SF-RF1-RF2-IF1-RF3-IF2-RF4-EF								3. Ligationrunde
Größe des Ligationsproduktes [bp]	1308								

3.4.3 Herstellung Trypsiligase-präsentierender Phagen

Die Propagierung Trypsiligase-präsentierender Phagen erfolgte durch *E. coli* ER2738-Zellen, welche mit einem entsprechenden Phagemidkonstrukt transformiert wurden. Hierzu wurden 5 ml 2xYT-Medium (versetzt mit 100 µg/ml Carbenicillin) mit einer Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Anschließend wurden 20 ml 2xYT-Medium (versetzt mit 100 µg/ml Carbenicillin) mit 0,5 ml der Vorkultur beimpft und bis zum Erreichen

einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Nach Abkühlen der Kultur auf 25 °C folgte eine Superinfektion der ER2738-Zellen durch Zugabe des Helferphagen M13K07 bei einer *multiplicity of infection* (MOI) von 2,5. Nun wurde die Kultur für 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation für 30 min bei 30 °C und 150 rpm wurde die Kultur für 10 min bei 4000xg und 4 °C zentrifugiert. Nun wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 40 ml vorgewärmtem 2xYT-Medium (versetzt mit 100 µg/ml Carbenicillin sowie 0,02 µg/ml Anhydrotetracyclin) resuspendiert. Nach 30 minütiger Inkubation bei 28 °C und 150 rpm erfolgte die Zugabe von Kanamycin (50 µg/ml) und es folgte eine weitere Inkubation für 12 h bei 28 °C und 150 rpm. Anschließend wurde für 20 min bei 4000xg und 4 °C zentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde dekantiert und filtriert (0,45 µM Filter). Nun erfolgte die Präzipitation der sekretierten Phagenpartikel durch Zugabe von 1/4 Volumenanteil PEG-Lösung (vgl. 2.2, S. 35). Nach einer Inkubation für 2 h bei 4 °C folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min bei 11440xg und 4 °C. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Phagenpellet in 10 ml Puffer TP (vgl. 2.2, S. 35) resuspendiert. Anschließend erfolgte eine weitere Präzipitation der Phagenpartikel durch Zugabe von 1/8 Volumenanteil PEG-Lösung und Inkubation für 2 h bei 4 °C. Nach Zentrifugation für 30 min bei 11440xg und 4 °C wurde das Phagenpellet in 2 ml Puffer TP resuspendiert. Aggregierte Phagenpartikel wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 16000xg und 4 °C abgetrennt. Die so erhaltene Phagenlösung wurde direkt für Folgeexperimente eingesetzt. Für eine Langzeitlagerung bei -80 °C wurde die Phagenlösung mit einem Volumenanteil 86 %igem Glycerol versetzt, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefrosten.

Für die Bestimmung des Phagentiters wurde eine serielle Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor 10 hergestellt. Hierzu wurden jeweils 10 µl einer verdünnten Phagenlösung mit 90 µl Puffer TP vermischt. Je 90 µl der Verdünnungsstufen 10⁻⁶ bis 10⁻¹¹ wurden zu 810 µl *E. coli* ER2738 gegeben, welche sich in einer logarithmischen Wachstumsphase befanden und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 90 µl der infizierten Zellen auf 2xYT-Agarplatten (versetzt mit 100 µg/ml Carbenicillin) ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Nach Bestimmung der Kolonienanzahl wurde der Phagentiter mittels Gleichung 4 berechnet.

$$\mathbf{Phagentiter} \left(\frac{cfu}{ml} \right) = \frac{\mathbf{Kolonienanzahl * Verdünnungsstufe}}{\mathbf{V_{Phagen}}} \quad \text{(Gl. 4)}$$

V_{Phagen} = Volumen der für die serielle Verdünnung eingesetzten Phagenlösung in ml

3.4.4 Durchführung der Selektion mittels Phagen-Display

Die Propagierung der Trypsiligase-basierten naiven Phagen-Bibliothek erfolgte wie unter 3.4.3 (S. 73) beschrieben, wobei für die Inokulation der Hauptkultur der unter 3.4.2 (S. 68) angelegte Glycerolstock verwendet wurde. Die Start-OD₆₀₀ betrug hierbei 0,05.

Es wurden zwei separate Selektionen durchgeführt, welche sich hinsichtlich der verwendeten Streptavidin-beschichteten magnetischen *beads* unterschieden (Selektion A: M270-*beads*; Selektion B: M280-*beads*; vgl. 2.11, S. 46). Bei beiden Selektionen wurden insgesamt vier Selektionsrunden durchgeführt, deren Parameter Tabelle 21 zu entnehmen sind.

Generell wurden für Selektion A der 10 x *blocking*-Puffer sowie die Puffer TP und TPT0,01 eingesetzt und für Selektion B die Puffer TP, TPB sowie TPBT0,05 (vgl. 2.2, S. 35). Zur Abnahme von Überständen nach Inkubations- oder Waschschritten wurden die *beads* für jeweils eine Minute magnetisch fokussiert. Für alle Arbeitsschritte wurden Eppendorf-Protein-Lobind-Reaktionsgefäße verwendet. Die in der jeweiligen Selektionsrunde verwendete Substratmenge korrelierte mit der eingesetzten Menge an magnetischen *beads*, welche mit biotinyliertem Peptidsubstrat gesättigt waren. Die Durchführung einer einzelnen Selektionsrunde gestaltete sich wie folgt:

Zur Vorbereitung der magnetischen *beads* wurden diese 3 x mit 500 µl TP gewaschen und über Nacht bei 4 °C in 500 µl 10 x *blocking*-Puffer / TPB inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 500 µl TP wurden die *beads* in 200 µl des biotinylierten Peptidsubstrates (20 µM in Puffer TP) resuspendiert und für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges Substrat wurde durch dreimaliges Waschen entfernt. Nun folgte die Zugabe von 200 µl der Phagenbibliothek (verdünnt in Puffer TP mit 100 µM ZnCl₂), welche für 60 min bei 30 °C mit dem immobilisierten Peptidsubstrat inkubiert wurde. In der vierten Selektionsrunde wurde dem Inkubationsschritt mit immobilisiertem Substrat ein Prä-Inkubationsschritt vorgelagert, bei dem die Phagenbibliothek mit einer äquivalenten Menge unbeladener magnetischer *beads* für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Hierdurch sollten Trypsiligase-Varianten, welche unspezifisch mit der *bead*-Oberfläche interagieren, abgereichert werden. Zur Reduktion inaktiver oder schnell hydrolysierender Trypsiligase-Varianten wurden mehrere Waschschriffe durchgeführt, deren Anzahl und Dauer Tabelle 21 zu entnehmen sind. Zur Bestimmung des Phagentiters wurden vom jeweils letzten Waschschriff 10 µl abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Anschließend erfolgte die aminolytische Elution kovalent gebundener Acyl-Enzym-Phagen-Intermediate durch Zugabe von 500 µl Nukleophil (Konzentration entsprechend Tabelle 21; in Puffer TP mit 100 µM Zink), sowie durch eine Inkubation bei 30 °C und 500 rpm. Die jeweilige Nukleophilkonzentration sowie Inkuba-

tionsdauer (Elutionszeit) sind ebenfalls Tabelle 21 zu entnehmen. Nach Ablauf der entsprechenden Elutionszeit wurden die *beads* magnetisch fokussiert und der Überstand (Elutionsfraktion) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung des Phagentiters der Elutionsfraktion wurden 10 µl abgenommen. Die Titration der Phagen für Wasch- und Elutionsfraktion erfolgte wie unter 3.4.3 beschrieben.

Tabelle 21: Übersicht zu den verwendeten Selektionsparametern der einzelnen Selektionsrunden.

Selektionsrunde	Substrat-Menge (pmol)	Nukleophil-konzentration (µM)	Anzahl / Dauer Waschschrte	Prä-inkubation	Elutionszeit (min)
Selektion A					
1	650	100	3 x TPT0,1 1 min 2 x TP 1 min	nein	30
2	325	50	5 x TPT0,1 1 min 3 x TP 1 min	nein	20
3	325	10	7 x TPT0,1 1 min 3 x TP 1 min	nein	15
4	162,5	2	9 x TPT0,1 1 min 2 x TP 1 min 1 x TP 5 min	ja	10
Selektion B					
1	650	100	3 x TPBT0,05 1 min 2 x TP 1 min	nein	30
2	325	50	5 x TPBT0,05 1 min 3 x TP 1 min	nein	20
3	325	10	7 x TPBT0,05 1 min 3 x TP 1 min	nein	15
4	162,5	2	9 x TPBT0,05 1 min 2 x TP 1 min 1 x TP 5 min	ja	10

Zu den verbleibenden 490 µl der eluierten Phagen wurden 1 ml *E. coli*-ER2738-Zellen gegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 30 °C wurden die infizierten Zellen auf drei 2xYT-Agarplatten (versetzt mit 100 µg/ml Carbenicillin) ausgestrichen und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Es folgte das Abschwemmen der gewachsenen *E. coli*-Kolonien mit 2 ml 2xYT-Medium je Agarplatte. Die vereinigte Zellsuspension wurde mit Glycerol (Endkonzentration 25 % (v/v)) versetzt und zu jeweils 1,5 ml aliquotiert. Nach Bestimmung der optischen Dichte (OD₆₀₀) wurden die Aliquote in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die *glycerolstocks* einer entsprechenden Selektionsrunde wurden jeweils zur Propagierung

eines neuen Phagenpools verwendet, welcher schließlich für die darauffolgende Selektionsrunde eingesetzt wurde. Um potentiell verbesserte Trypsiligase-Varianten durch ein Hochdurchsatz-Screening identifizieren zu können, wurden die korrespondierenden Gensequenzen von Varianten der vierten Selektionsrunde in den Expressionsvektor pPICZ α A kloniert. Hierzu wurden zunächst mit den Glycerolstocks aus der vierten Selektionsrunde für Selektion A und B Schüttelkulturen im 40 ml-Maßstab mit 2xYT-Medium angesetzt. Nach einer Inkubation für 4 h bei 37 °C und 150 rpm erfolgten Zellernte sowie Isolation der Plasmid-DNA wie unter 3.1.1 (S. 50) beschrieben. Anschließend wurden die Gensequenzen der selektierten Trypsiligase-Varianten PCR-basiert unter Verwendung des *primer*-Paares 4xTn_pPICZalpha_fwd und 4xTn_pPICZalpha_rev (vgl. 2.7, S. 42) amplifiziert. Über die hierdurch eingeführte XhoI- sowie AgeI-Schnittstelle erfolgte die Klonierung in den Vektor pPICZ α A (vgl. 3.1.7., S.52). Die hieraus resultierenden Expressionsplasmide pPICZ α -LibMB_4RdA und pPICZ α -LibMB_4RdB wurden bis zu deren weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.5 *ELISA*-basiertes Screening im Hochdurchsatz

Im Rahmen der durchgeführten Selektion mittels Phagen-Display sollten innerhalb einer Variantenbibliothek Biokatalysatoren mit verbesserten Syntheseigenschaften durch einen gezielten Selektionsdruck angereichert werden. Zur Identifikation entsprechend optimierter Biokatalysatoren wurden die Varianten-*pools* der vierten Selektionsrunde im Hochdurchsatz durchgemustert. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *ELISA*-basiertes Screeningsystem etabliert (Abb. 8), welches erste Primärdaten zur Syntheseeffizienz von Einzelvarianten generieren sollte. Wie in Abbildung 8 schematisch dargestellt, wurden in einem ersten Schritt einzelne Trypsiligase-Varianten aus der vierten Selektionsrunde rekombinant in *P. pastoris* im 96-*deepwell* Mikrotiterplattenformat hergestellt.

Hierzu wurden *P. pastoris* X33-Zellen mit den linearisierten Expressionsplasmiden pPICZ α -LibMB_4RdA und pPICZ α -LibMB_4RdB (vgl. 3.4.4, S. 75), wie unter 3.2.2.2 (S. 57) beschrieben, transformiert und anschließend auf einer Q-Tray Platte mit YPD-Agar (versetzt mit 100 μ g/ml Zeocin) ausplattiert. Nach einer Inkubation für 120 h bei 30 °C wurden für Selektion A und B jeweils 368 zufällige Einzelkolonien automatisiert mittels des Koloniepicker-Systems QPix2 gepickt und in vier 300 μ l 96-*well*-Mikrotiterplatten, welche zuvor mit 150 μ l YPD-Medium (versetzt mit 100 μ g/ml Zeocin) je Kavität beschickt wurden, überführt. Hierbei wurden je Mikrotiterplatte die Kavitäten C2, C3, E7 und E8 frei gelassen. Diese wurden

manuell mit *P. pastoris* X33-Zellen ohne pPICZ α A als Negativkontrolle (für die Kavitäten C2 und C3) sowie *P. pastoris* X33-Zellen mit pPICZ α A-4Tn (codiert für Trypsiligase) als Positivkontrolle (für die Kavitäten E7 und E8) inokuliert. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 30 °C und 750 rpm im Schüttelinkubator (Modell TH 15, vgl. 2.11, S. 46) inkubiert. Zum Ansetzen der Hauptkulturen wurden die Übernachtskulturen zur Inokulation von 96-*deepwell*-Mikrotiterplatten (Kavitätenvolumen 2 ml) verwendet, welche zuvor mit 400 μ l BMD-Medium (vgl. 2.3, S. 37) je Kavität beschickt wurden. Für eine spätere Herstellung potentiell verbesserter Trypsiligase-Varianten im Großmaßstab wurden die in 96-*well* Mikrotiterplatten befindlichen Übernachtskulturen mit 50 μ l 86 %igem Glycerin versetzt und bei -80 °C als *glycerolstock* gelagert. Für die Proteinherstellung im 96-*deepwell*-Format erfolgte eine Inkubation für 48 h bei 30 °C und 350 rpm im Schüttelinkubator (Modell Ecotron, vgl. 2.11, S. 46). Anschließend wurde die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 400 μ l BM-Medium (versetzt mit 6 % (v/v) Methanol, Endkonzentration 3 % (v/v)) gestartet und es folgte eine Inkubation für 72 h bei 30 °C und 350 rpm im Schüttelinkubator. Die in den Kulturüberstand sekretierten Trypsiligase-Varianten wurden durch einen Zentrifugationschritt für 30 min bei 3000xg und 4 °C von den *P. pastoris*-Zellen separiert. Anschließend wurden für einen Umpufferungsschritt 200 μ l Kulturüberstand je Kavität in eine 96-*well* MultiScreen™ Filterplatte überführt. Die Umpufferung erfolgte durch vier Zentrifugationsschritte für 30 min bei 3000xg und 4 °C, wobei zwischen den einzelnen Zentrifugationsschritten eine Zugabe von 300 μ l Messpuffer (vgl. 2.2, S. 35) je Kavität erfolgte. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt folgte eine Zugabe von 200 μ l Messpuffer je Kavität. Nach einer Inkubation für 30 min bei 550 rpm und 15 °C im Thermomixer wurden 200 μ l der Proteinlösung in eine 96-*well* Mikrotiterplatte überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Nun erfolgte die Durchführung des *ELISA*-basierten Screenings. Der finale Reaktionsansatz für die Transamidierungsreaktion setzte sich wie folgt zusammen: 50 % (v/v) des umgepufferten Überstandes, 25 μ M Peptidsubstrat (Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH), 50 μ M Nukleophil (H-RHAAGEQKLISEEDL-OH), 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 7.8 bei 30 °C.

Für das Ansetzen der Transamidierungsreaktion wurde eine 96-*well*-Mikrotiterplatte (aus Polypropylen) mit 85 μ l eines zweifach konzentrierten Substratmixes (beinhaltet Peptidsubstrat, Nukleophil sowie Zinkchlorid in Messpuffer) beschickt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 85 μ l des umgepufferten Kulturüberstandes gestartet. Um den zeitlichen Verlauf der Produktbildung verfolgen zu können, wurde die Reaktion nach vier distinkten

Zeitpunkten (5, 30, 60 und 150 min) abgestoppt. Hierzu wurden jeweils 35 μl des Reaktionsmix in eine neue 96-*well*-Mikrotiterplatte überführt, welche zuvor mit 50 μl Abstopppuffer je Kavität beschickt wurde. Für eine sich anschließende Quantifizierung des Transamidierungsproduktes (Aminolyseprodukt) mittels *ELISA* wurden jeweils 25 μl der vier abgestoppten Reaktionsansätze auf einer Streptavidin-beschichteten 384-*well*-Mikrotiterplatte konsolidiert. Es folgte die Immobilisierung aller biotinylierten Peptide des Reaktionsansatzes (Peptidsubstrat, Aminolyse- sowie Hydrolyseprodukt) durch Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur.

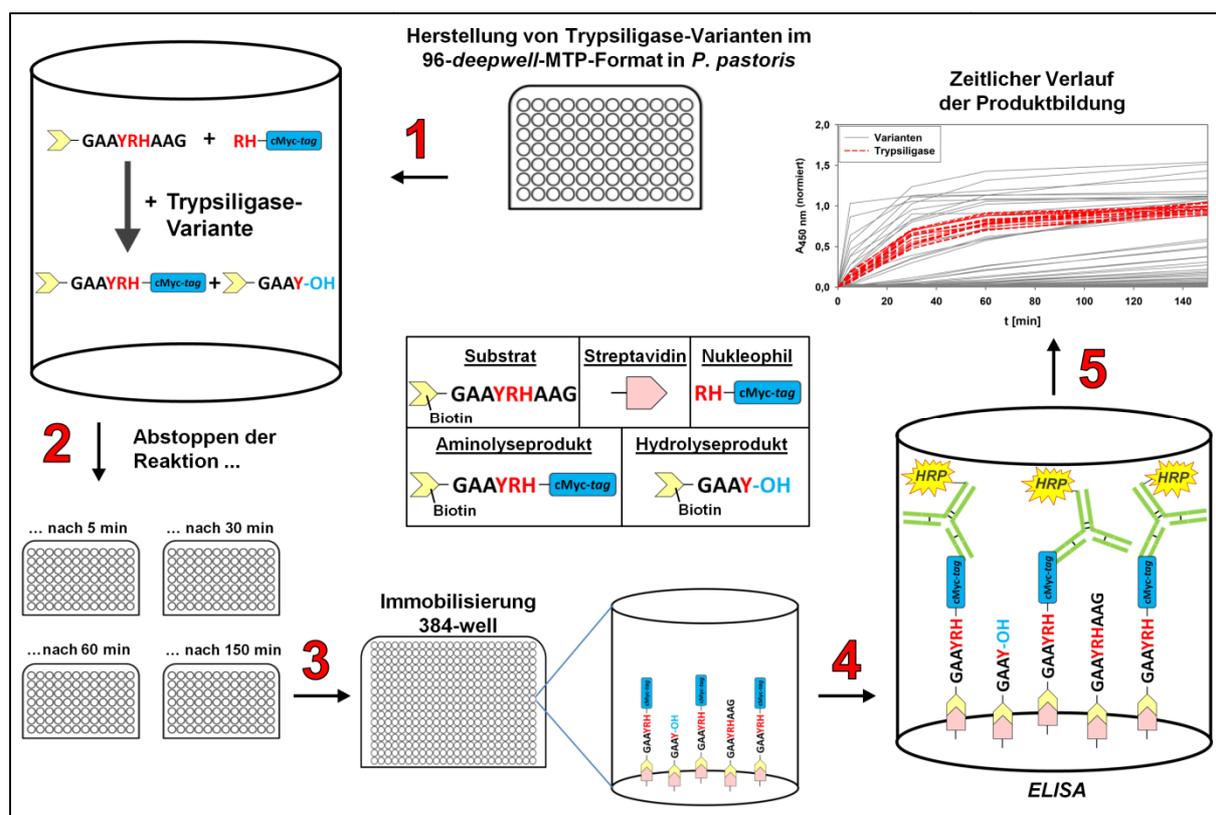


Abbildung 8: Schematische Darstellung des *ELISA*-basierten Hochdurchsatz-Screenings zur Identifizierung potentiell verbesserter Biokatalysatoren. Zur Durchmusterung der mittels Phagen-Display selektierten Biokatalysatoren werden einzelne Trypsiligase-Varianten im 96-*deepwell*-Mikrotiterplattenformat in *P. pastoris* hergestellt. Mit den im Kulturüberstand befindlichen Trypsiligase-Varianten werden *ELISA*-basierte Progresskurven für die Bildung des Syntheseproduktes erstellt. 1) Durchführung von Transamidierungsreaktionen um 96-*well*-Format. 2) Abstoppen der Transamidierungsreaktion nach vier distinkten Zeitpunkten. 3) Konsolidierung der vier abgestoppten Reaktionsansätze in eine mit Streptavidin beschichtete 384-*well* Mikrotiterplatte. 4) *ELISA*-basierte Quantifizierung des immobilisierten Transamidierungsproduktes durch einen Anti-cMyc-Antikörper. 5) Graphische Auswertung durch Auftragung der normalisierten Signalintensitäten (vgl. S. 80) als Funktion der Reaktionszeit.

Nach dreimaligem Waschen mit 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ TBST0,05 folgte eine Inkubation mit 25 $\mu\text{l}/\text{well}$ primärem Anti-cMyc-Antikörper (1:3000 in TBST0,05 verdünnt) sowie sekundärem POD-konjugiertem Anti-Maus-Antikörper (1:5000 in TBST0,05 verdünnt) für 1 h bei Raumtemperatur. Hierbei bindet der primäre Antikörper spezifisch an den cMyc-tag, welcher sich aus-

schließlich im Aminolyseprodukt wiederfindet. Nach jeweils dreimaligem Waschen mit 100 $\mu\text{l/well}$ TBST0,05 sowie TBS folgte eine Inkubation mit 25 $\mu\text{l/well}$ TMB-Substrat (TMB One, vgl. 2.1, S. 33), wobei die Farbreaktion nach 5 min mit 25 $\mu\text{l/well}$ 0,5 M H_2SO_4 abgestoppt wurde. Anschließend wurde die Extinktion bei 450 nm mittels Biomek™ Paradigm Reader (vgl. 2.11, S. 46) gemessen und um den Wert bei 620 nm korrigiert. Die grafische Auswertung zum zeitlichen Verlauf der Produktbildung erfolgte durch eine Auftragung der gemessenen Signalintensitäten gegen den Zeitpunkt des Abstoppens der Reaktion. Der Nullwert aller gemessenen Varianten ergab sich aus dem Mittelwert der beiden mitgeführten Negativkontrollen (ohne Enzym). Damit die zeitlichen Verläufe der Varianten von unterschiedlichen Mikrotiterplatten miteinander verglichen werden konnten, wurde eine platteninterne Normierung vorgenommen. Hierbei wurden alle Messwerte einer Mikrotiterplatte durch den Mittelwert der Signalintensität dividiert, welche die beiden Positivkontrollen (Trypsiligase) bei einer Reaktionszeit von 150 Minuten aufwiesen.

3.6 Methoden zur enzymatischen Charakterisierung

3.6.1 Hydrolysestudien

Bestimmung von spezifischen Hydrolyseaktivitäten

Zur Bestimmung der Substratspezifität von verbesserten Trypsiligase-Varianten wurden zunächst die initialen Hydrolysegeschwindigkeiten gegenüber ausgewählten Peptidsubstraten mit der allgemeinen Sequenz Bz-AAX_{aa1}X_{aa2}X_{aa3}AAG-OH bestimmt. Die Messungen erfolgten maximal bis zu einem Substratumsatz von 5 %. Hierbei wurden folgende Reaktionsbedingungen eingesetzt: 1 mM Peptidsubstrat, 1-5 μM Trypsiligase-Variante in Messpuffer (vgl. 2.2, S. 35; 100 mM HEPES pH 7,8 bei 30 °C, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl_2) sowie 100 μM ZnCl_2 . Die enzymkatalysierte Reaktion wurde bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Nach Temperierung des Reaktionsansatzes für 10 min bei 30 °C wurde die Reaktion durch Enzymzugabe gestartet. Zu ausgewählten Zeitpunkten erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch Überführung eines Aliquots des Reaktionsansatzes in Essigsäure. Die Endkonzentration an Essigsäure betrug 10 % (v/v). Die Analyse der Zusammensetzung des Produktgemisches erfolgte mittels *reverse-phase*-HPLC an einem Breeze™-HPLC-System mit einer BEH-C18-Säule (vgl. 2.11, S. 46). Die Trennung erfolgte durch Elution mit einem linearen Acetonitril/Wasser-Gradienten. Hierbei erfolgte die Detektion aller Peptidspezies mit *N*-terminaler Benzoyl-Schutzgruppe (dies sind Substrat und Hydrolyseprodukt) bei einer De-

tektionswellenlänge von 254 nm. Die Berechnung des Umsatzes pro Zeit erfolgte aus den Verhältnissen der integrierten Peakflächen von Substrat und Hydrolyseprodukt. Die Angabe der Hydrolyseaktivität für die verschiedenen Peptidsubstrate erfolgt als apparente Wechselzahl, da unterschiedliche Enzymkonzentrationen für die Bestimmung der initialen Hydrolysegeschwindigkeit verwendet wurden.

Bestimmung von K_m und k_{cat} für das Substrat

Für die Peptide mit den höchsten Umsatzgeschwindigkeiten wurden in weitergehenden Studien die enzymkinetischen Parameter K_m und k_{cat} bestimmt. Hierfür wurden folgende Reaktionsbedingungen eingesetzt: 67,5-5000 μM Peptidsubstrat, 0,25-0,5 μM Trypsin-Variante in Messpuffer (mit 100 μM ZnCl_2). Die enzymkatalysierte Reaktion wurde bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Das Starten und Abstoppen der Reaktion sowie die Analyse des Produktgemisches erfolgte wie bei der Bestimmung der spezifischen Hydrolyseaktivitäten. Es erfolgte eine lineare Auftragung der apparenten Wechselzahlen gegen die Substratkonzentration. Durch eine nichtlineare Regressionsanalyse der Sättigungshyperbel mittels Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 5) wurden die enzymkinetischen Parameter K_m und k_{cat} für das Substrat bestimmt.

$$k_{cat}^{app} = \frac{v}{[E_0]} = k_{cat} * \frac{[S_0]}{K_m + [S_0]} \quad (\text{Gl. 5})$$

- v = Katalysegeschwindigkeit
- k_{cat}^{app} = apparente Wechselzahl
- k_{cat} = Katalysekonstante
- K_m = Michealiskonstante
- $[S_0]$ = eingesetzte Substratkonzentration
- $[E_0]$ = eingesetzte Enzymkonzentration

3.6.2 Transamidierungsstudien

Primäre enzymatische Charakterisierung via Transamidierungskinetiken

Die initiale Beurteilung der Syntheseeffizienz identifizierter Trypsiligase-Varianten erfolgte durch eine Transamidierungsreaktion mit dem Modellsubstrat Bz-AAyrHAAG-OH sowie dem Nukleophil H-RHAAGEQKLISEEDL-OH. Hierfür wurden folgende Reaktionsbedingungen eingesetzt: 250 μM Bz-AAyrHAAG-OH, 500 μM H-RHAAGEQKLISEEDL-OH, 2,5-40 μM Trypsiligase-Variante in Messpuffer (mit 100 μM ZnCl_2). Die enzymkatalysierte Reaktion wurde bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Das Starten und Abstoppen der Reaktion erfolgte wie unter 3.6.1 (S. 80) beschrieben. Die Analyse der Zusammensetzung des Produktgemisches erfolgte mittels *reverse-phase*-HPLC an einem Waters ACQUITY UPLC-System mit einer BEH-C18-Säule (vgl. 2.11, S. 46). Die Trennung erfolgte durch Elution mit einem linearen Acetonitril/Wasser-Gradienten. Hierbei erfolgte die Detektion aller Peptidspezies mit *N*-terminaler Benzoyl-Schutzgruppe (dies sind Substrat und Hydrolyse- sowie Aminolyseprodukt) bei einer Detektionswellenlänge von 254 nm. Die Berechnung der Produktbildung pro Zeit erfolgte aus den Verhältnissen der integrierten Peakflächen von Substrat, Hydrolyseprodukt und Aminolyseprodukt. Neben der Angabe der maximalen Ausbeute an Aminolyseprodukt und dem Anteil an Hydrolyseprodukt zum Zeitpunkt des Maximums erfolgte die Angabe der Aminolyse- und Hydrolysegeschwindigkeiten als apparente Wechselzahl, da teils unterschiedliche Enzymkonzentrationen für die Messungen verwendet wurden.

Erstellung eines Syntheseprofils

Für die Erstellung des Syntheseprofils einer Trypsiligase-Variante wurde ebenfalls das Modellsubstrat Bz-AAyrHAAG-OH sowie das Nukleophil H-RHAK-OH eingesetzt. Hierfür wurden Transamidierungskinetiken bei zwei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (15 μM und 250 μM Bz-AAyrHAAG-OH) sowie variierenden molaren Äquivalenten Nukleophil (2, 5, 10 und 20 Äquivalente) aufgenommen. Die Messungen erfolgten mit 0,5-10 μM Trypsiligase-Variante in Messpuffer (mit 100 μM ZnCl_2) bei einer Temperatur von 30 °C. Das Starten und Abstoppen der Reaktion sowie die Analyse des Produktgemisches erfolgte wie bei der Anfertigung von Transamidierungskinetiken beschrieben. Für die grafische Auswertung wurden die bei entsprechender Substratkonzentration erreichten maximalen Produktausbeuten gegen die Anzahl an molaren Äquivalenten des eingesetzten Nukleophils aufgetragen.

Für die Variante mit den besten Syntheseigenschaften wurde in weitergehenden Studien die Temperatur- und Zinkionenabhängigkeit untersucht sowie der K_m und k_{cat} für das Nukleophil

bestimmt. Hierzu erfolgte die gleichzeitige Messung der initialen Aminolyse- sowie Hydrolysegeschwindigkeiten bei den im Folgenden aufgeführten Reaktionsbedingungen. Die Messung der Aminolysegeschwindigkeit erfolgte maximal bis zu einem Gesamtanteil von 7,5 % Aminolyseprodukt, die der Hydrolysegeschwindigkeit maximal bis zu einem Anteil von 5 % Hydrolyseprodukt.

Bestimmung von K_m und k_{cat} für das Nukleophil

Es wurden folgende Reaktionsbedingungen eingesetzt: 80 μM Bz-AAYRHAAG-OH, 10-9600 μM H-RHAK-OH, 0,1 μM Trypsilignase-Variante in Messpuffer (mit 100 μM ZnCl_2). Die enzymkatalysierte Reaktion wurde bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Das Starten und Abstoppen der Reaktion sowie die Analyse des Produktgemisches erfolgte wie bei der Anfertigung von Transamidierungskinetiken beschrieben. Es erfolgte eine lineare Auftragung der apparenten Wechselzahlen gegen die Substratkonzentration. Durch eine nicht-lineare Regressionsanalyse mittels Gleichung 6 wurden die enzymkinetischen Parameter K_m und k_{cat} sowie K_i für das Nukleophil bestimmt. Mittels Gleichung 7 und 8 wurden die optimale Nukleophilkonzentration sowie die optimale apparente Wechselzahl berechnet. K_m' und k_{cat} wurden mittels Gleichung 9 ermittelt.

$$k_{cat}^{app} = \frac{k_{cat} * [N_0]}{1 + \frac{K_m}{[N_0]} + \frac{[N_0]}{K_i}} \quad (\text{Gl. 6})$$

- k_{cat}^{app} = apparente Wechselzahl
- k_{cat} = Katalysekonstante
- K_m = Michealiskonstante
- K_i = Inhibitorkonstante
- $[N_0]$ = eingesetzte Nukleophilkonzentration

$$[N_{opt}] = \sqrt{K_m * K_i} \quad (\text{Gl. 7})$$

- K_m = Michealiskonstante
- K_i = Inhibitorkonstante
- $[N_{opt}]$ = optimale Nukleophilkonzentration

$$k_{\text{cat}}^{\text{app,opt}} = \frac{k_{\text{cat}}}{1 + 2\sqrt{\frac{K_m}{K_i}}} \quad (\text{Gl. 8})$$

- $k_{\text{cat}}^{\text{app,opt}}$ = optimale apparente Wechselzahl
 k_{cat} = Katalysekonstante
 K_m = Michealiskonstante
 K_i = Inhibitorkonstante

$$k_{\text{cat}}^{\text{app}} = k_{\text{cat}} - \left(\frac{k_{\text{cat}} * [\text{N}_0]}{K_m' + [\text{N}_0]} \right) \quad (\text{Gl. 9})$$

- $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ = apparente Wechselzahl
 k_{cat} = Katalysekonstante
 K_m' = Michealiskonstante
 $[\text{N}_0]$ = eingesetzte Nukleophilkonzentration

Studien zur Temperaturabhängigkeit

Es wurden folgende Reaktionsbedingungen eingesetzt: 80 μM Bz-AAYRHAAG-OH, 400 μM H-RHAK-OH, 0,05-0,4 μM Trypsiligase-Variante in Messpuffer (mit 100 μM ZnCl_2). Die Messungen erfolgten bei 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 40 °C und 50 °C, wobei der pH-Wert des Puffers bei der entsprechenden Temperatur 7,8 betrug. Das Starten und Abstoppen der Reaktion sowie die Analyse des Produktgemisches erfolgte wie bei der Anfertigung von Transamidierungskinetiken beschrieben.

Da die Messungen bei einer konstanten Substratkonzentration erfolgten, welche dem K_m -Wert des Substrates entspricht, vereinfacht sich Gleichung 4 wie folgt:

$$k_{\text{cat}}^{\text{app}} = \frac{k_{\text{cat}}}{2} \quad (\text{Gl. 10})$$

- $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ = apparente Wechselzahl
 k_{cat} = Katalysekonstante

Somit entsprechen die ermittelten apparenten Wechselzahlen der halbmaximalen Katalysekonstante. Für die grafische Auswertung wurden die theoretischen Wechselzahlen (Katalysekonstante) gemäß Gleichung 10 berechnet und temperaturnormiert gegen die reziproke absolute Messtemperatur aufgetragen.

Die Bestimmung der thermodynamischen Parameter ΔH^\ddagger sowie ΔS^\ddagger erfolgten durch eine lineare Regressionsanalyse mittels der linearisierten EYRING-Gleichung (Gl. 11).

$$\ln \left(\frac{k_{\text{cat}}^{\text{app}}}{T} \right) = \frac{-\Delta H^\ddagger}{R} * \frac{1}{T} + \ln \left(\frac{k_B}{h} \right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (\text{Gl. 11})$$

$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$	=	apparente Wechselzahl
R	=	Allgemeine Gaskonstante
T	=	Absolute Messtemperatur
$[N_0]$	=	eingesetzte Nukleophilkonzentration
ΔG^\ddagger	=	Freie Aktivierungsenthalpie
ΔH^\ddagger	=	Aktivierungsenthalpie
ΔS^\ddagger	=	Aktivierungsentropie
k_B	=	Boltzmannkonstante
h	=	Planksche Konstante

Die freie Aktivierungsenthalpie wurde schließlich mittels der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Gl. 12) berechnet.

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T * \Delta S^\ddagger \quad (\text{Gl. 12})$$

ΔG^\ddagger	=	Freie Aktivierungsenthalpie
ΔH^\ddagger	=	Aktivierungsenthalpie
ΔS^\ddagger	=	Aktivierungsentropie
T	=	Absolute Messtemperatur

Studien zur Zinkabhängigkeit

Es wurden folgende Reaktionsbedingungen eingesetzt: 80 μM Bz-AAYRHAAG-OH, 400 μM H-RHAK-OH, 0,1 μM Trypsiligase-Variante in Messpuffer, wobei die finale

Konzentration von Zinkchlorid 0-800 μM betrug. Die enzymkatalysierte Reaktion wurde bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Das Starten und Abstoppen der Reaktion sowie die Analyse des Produktgemisches erfolgte wie bei der Anfertigung von Transamidierungskinetiken beschrieben. Für die graphische Auswertung wurde die apparente Wechselzahl gegen die Zinkionenkonzentration aufgetragen.

3.6.3 Modifizierung von Antikörperfragmenten

Die Modifizierung von zwei Antikörperfragmenten mit jeweils zwei unterschiedlichen Nukleophilen verlief in Analogie zu den unter 3.6.2 (S. 82) beschriebenen Transamidierungsstudien. Für die Modifizierung des Her2-spezifischen Fab-Fragmentes wurden zwei Nukleophile eingesetzt, welche mit 5(6)-Carboxyfluorescein (H-RHAK(CF)-OH) sowie dem Emtansin DM1 (H-RHAK(DM1)-OH) derivatisiert waren. Für das TNF α -spezifische Fab-Fragment wurde ebenfalls das H-RHAK(CF) verwendet sowie ein mit Polyethylenglykol (Molekulargewicht ca 21000 Da; H-RHAK(PEG20k)AAK(DNP)-OH) derivatisiertes Nukleophil. Es wurden folgende Reaktionsbedingungen eingesetzt: 100 μM Fab-Fragment, 200-1000 μM Nukleophil, 10 μM Trypsinase-Variante in Messpuffer (mit 100 μM ZnCl_2). Die enzymkatalysierte Reaktion wurde bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Die Analyse der Zusammensetzung des Produktgemisches erfolgte mittels hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) an einem BreezeTM-HPLC-System in Kombination mit einer TSKgel-Butyl-NPR-Säule (vgl. 2.11, S. 46). Die Trennung erfolgte durch Elution mit einem linearen Gradienten von 100 % HIC-Puffer A auf 100 % HIC-Puffer B in 15 Minuten. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Produktausbeute wurde aus den Verhältnissen der integrierten Peakflächen von Substrat, Hydrolyseprodukt und Aminolyseprodukt berechnet. Hierbei wurden die Peakflächen auf die spezifischen Extinktionskoeffizienten der einzelnen Fab-Spezies normiert. Zusätzlich zu der Darstellung der Progresskurven erfolgte die Angabe der Aminolyse- und Hydrolysegeschwindigkeiten als apparente Wechselzahl.

3.6.4 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der apparenten Wechselzahlen erfolgte über die Standardabweichung bei der linearen Regression von mindesten vier Messwerten. Für Produktausbeuten wurde der Mittelwert aus zwei Messungen ermittelt und daraus die mittlere absolute Abweichung abgeleitet.

4 Ergebnisse

Im Arbeitskreis BORDUSA (MLU Halle-Wittenberg) konnte durch ein rationales Enzym-Engineering eine Trypsinvariante (Trypsiligase) erzeugt werden, welche basierend auf einer Transamidierungsreaktion die C-terminale Modifikation von Zielproteinen katalysiert. Desweiteren konnte innerhalb des Arbeitskreises das Phagen-Display als Selektionsmethode für die gerichtete Evolution von Trypsiligase etabliert werden. Basierend auf Trypsiligase konnten im Rahmen einer solchen gerichteten Evolution Biokatalysatoren selektiert werden, welche eine gesteigerte Effizienz hinsichtlich der katalysierten Transamidierungsreaktion zeigten. Diese basierte im Wesentlichen auf einer verminderten Sekundärhydrolyse, welche wiederum zu einer erhöhten Produktstabilität führte. Es konnte jedoch keine Variante identifiziert werden, welche eine deutliche Steigerung hinsichtlich der Produktausbeute zeigte. Maßgeblich hierfür war eine methodische Limitierung bei der Durchführung des Phagen-Displays durch die unerwünschte Anreicherung von sogenannten *escape*-Mutanten. Hierbei handelt es sich um Phagen, welche die genetische Information für nicht funktionale Trypsinvarianten besitzen. Dadurch war die Anzahl an durchführbaren Selektionsrunden stark eingeschränkt, was wiederum die Stringenz des Selektionsdruckes stark verminderte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Effizienz der Selektion mittels Phagen-Display durch eine gezielte Repression von *escape*-Mutanten optimiert werden. Desweiteren sollte ein *ELISA*-basiertes Hochdurchsatz-Screening etabliert werden, mit welchem eine große Anzahl selektierter Trypsiligase-Varianten hinsichtlich einer verbesserten Syntheseeffizienz durchgemustert werden können. Die im Screening identifizierten Biokatalysatoren sollten nachfolgend hinsichtlich Funktionalität und Syntheseeffizienz charakterisiert werden. Letztlich sollte die Eignung einer vielversprechenden Trypsiligase-Variante zur Generierung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten beispielhaft durch eine enzymkatalysierte Modifizierung zweier Fab-Fragmente mit diversen Funktionalitäten gezeigt werden.

4.1 Optimierung der Selektion mittels Phagen-Display für Trypsiligase

4.1.1 Konstruktion eines optimierten Phagemidvektors

Zur Konstruktion eines Phagemidvektors für die Durchführung eines monovalenten Phagen-Displays wurde der Vektor pASK-IBA7plus als *scaffold* verwendet (Abb. 6A, S. 68). Dieser Vektor ermöglicht die Herstellung eines Zielproteins unter der Transkriptionskontrolle eines

induzierbaren *tetA*-Promotors/Operators, welcher eine sehr niedrige basale Expression aufweist.^[186] Zudem verfügt der Vektor über einen *fl ori*, welcher mit einer Verpackungssignalsequenz aus dem Genom filamentöser Phagen ausgestattet ist.^[187] Werden Phagemid-tragende *E. coli*-Zellen mit einem Helferphagen superinfiziert, ermöglicht die Signalsequenz die Verpackung von einzelsträngiger Phagemid-DNA während der Propagierung neuer filamentöser Phagen.

Die Konstruktion der beiden Phagemide pMB-03 und pMB-04 erfolgte wie unter 3.4.1 beschrieben. Diese beiden Vektoren unterscheiden sich hinsichtlich der flexiblen Linkerregion, welche sich zwischen dem zu präsentierenden Zielprotein und der C-terminalen Domäne von pIII (AS 252-406, im Weiteren als Δ pIII bezeichnet) befindet (vgl. Abb. 6C, S. 68). Vektor pMB-03 wurde für die *ELISA*-basierte Analyse der funktionalen Präsentation von Trypsiligase auf der Oberfläche des filamentösen Bakteriophagens M13 verwendet. Dieser codiert in der Linkerregion für einen sogenannten *MyCUT-tag*,^[183] welcher mit einer Länge von 14 Aminosäuren einen cMyc-tag sowie eine Schnittstelle für Wildtyptrypsin beinhaltet. In dem Vektor pMB-04, welcher für die Selektion verwendet wurde, war der *MyCUT-tag* durch eine Wildtyp pIII-Linker-Sequenz (AS 233-246) ersetzt (Abb. 6C, S. 68). Zum einen sollte hierdurch eine maximale Flexibilität zwischen dem zu präsentierenden Zielprotein und Δ pIII gewährleistet werden.^[188] Zum anderen konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich innerhalb der Trypsiligase-basierten Bibliothek Enzymvarianten befinden, bei denen die Wildtypspezifität von Trypsin durch die eingeführten Mutationen rekonstituiert wurde. Diese Varianten wären in der Lage, die Schnittstelle für Wildtyptrypsin innerhalb des *MyCUT-tags* zu spalten und somit die Phenotyp-Genotyp-Kopplung aufzuheben.

Für die *ELISA*-basierte Analyse wurden Trypsiligase-präsentierende M13-Phagen (im weiteren als Trypsiligase-Phagen bezeichnet) unter Verwendung der Vektoren pMB-03 sowie pMB-04, wie unter 3.4.3 (S. 73) beschrieben, hergestellt. Der *ELISA* wurde wie unter 3.3.4.3 (S. 65) beschrieben durchgeführt. Als Liganden wurden ein cMyc-spezifischer Antikörper sowie Wildtyp-Ecotin (vgl. 2.9; S. 44) immobilisiert. Mit Hilfe des Anti-cMyc-Antikörpers sollte bei den pMB-03 tragenden Trypsiligase-Phagen die vollständige Präsentation des artifizialen Fusionsproteins (bestehend aus Trypsiligase, Linkerregion und der Δ pIII) durch die Bindung des in der Linkerregion vorhanden cMyc-tags nachgewiesen werden (Abb. 9A). Eine Bestätigung der funktionalen Präsentation von Trypsiligase auf der Phagenoberfläche erfolgte sowohl für pMB-03 als auch für pMB-04 durch die Bindung des Trypsin-spezifischen Inhibitors Ecotin im aktiven Zentrum des Biokatalysators (Abb. 9B).

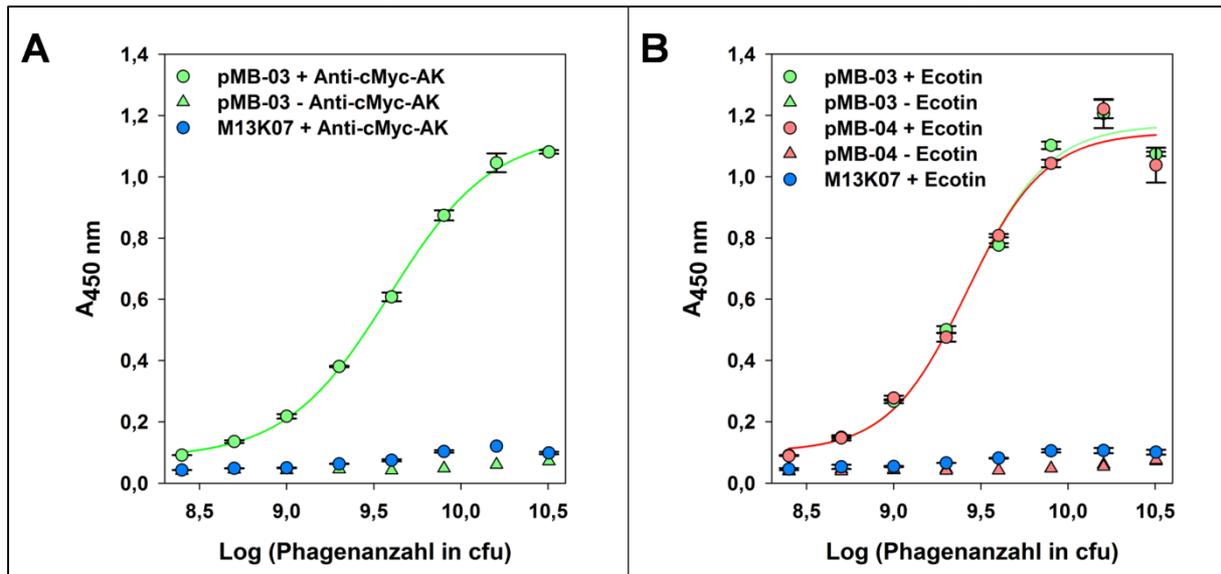


Abbildung 9: ELISA-basierte Bindungsstudien mit Trypsiligase-präsentierenden M13-Phagen. **A)** Nachweis der vollständigen Präsentation des Fusionspeptides auf M13-Phagen (mit verpacktem pMB-03-Phagemid) durch Detektion des cMyc-tags innerhalb der flexiblen Linkerregion. Als immobilisierter Ligand wurde eine Anti-cMyc-Antikörper eingesetzt. **B)** Nachweis der funktionalen Präsentation von Trypsiligase auf pMB-03- sowie pMB-04-tragenden M13-Phagen. Als immobilisierter Ligand wurde Ecotin verwendet. Die durch eine nichtlineare Regressionsanalyse ermittelten Wendepunkte sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Alle aufgetragenen Meßwerte stellen den Mittelwert zweier unabhängig durchgeführten Messungen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittlere absolute Abweichung.

Um sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen bezüglich der funktionalen Präsentation von Trypsiligase zu erhalten, wurden die immobilisierten Liganden mit einer variierenden Anzahl von Phagen inkubiert. Für die Auswertung wurde die logarithmierte Phagenanzahl gegen die Signalintensität aufgetragen. Durch eine sigmoidale Kurvenanpassung mittels Gleichung 3 (S. 66) konnte der Wendepunkt (x_0) ermittelt werden. Dieser entspricht jener Phagenanzahl, bei der die Signalintensität den halbmaximalen Wert aufweist. In Tabelle 22 sind die Wendepunkte respektive Phagenanzahlen zusammengefasst.

Tabelle 22: Übersicht zur sigmoidalen Kurvenanpassung der ELISA-basierten Analyse Trypsiligase-präsentierender M13-Phagen. Die Phagenanzahl ergibt sich aus dem entlogarithmierten Wendepunkt x_0 .

Setup	x_0	Phagenanzahl
pMB-03 + Anti-cMyc Antikörper	$9,59 \pm 0,02$	$3,89 \times 10^9 \pm 8,11 \times 10^6$
pMB-03 + Ecotin	$9,43 \pm 0,06$	$2,69 \times 10^9 \pm 1,71 \times 10^7$
pMB-04 + Ecotin	$9,42 \pm 0,07$	$2,63 \times 10^9 \pm 1,95 \times 10^7$

Für Trypsiligase-Phagen mit pMB-03 Phagemiden konnte mit dem Anti-cMyc-Antikörper als immobilisiertem Liganden eine spezifische Bindung detektiert werden. Hierbei stieg das Bindungssignal mit zunehmender Phagenanzahl an. Eine halbmaximale Signalintensität konnte bei $3,89 \times 10^9$ Phagen erhalten werden. Die Kontrollmessung mit Helferphagen lieferte kein

spezifisches Bindungssignal. Ebenfalls konnte bei Abwesenheit des Anti-cMyc-Antikörpers kein spezifisches Signal für pMB-03-tragende Phagen erhalten werden. Somit konnte die Präsentation des Fusionpeptides (bestehend aus Trypsiligase, Linkerregion mit cMyc-tag sowie $\Delta pIII$) bestätigt werden.

Durch eine spezifische Bindung der Trypsiligase-Phagen an den Inhibitor Ecotin konnte die funktionale Präsentation von Trypsiligase für pMB-03- sowie pMB-04-tragende M13-Phagen bestätigt werden. Halbmaximale Signalintensitäten konnten bei einer Phagenanzahl von $2,69 \times 10^9$ respektive $2,63 \times 10^9$ erreicht werden. Hieraus ergibt sich eine vergleichbare Funktionalität von Trypsiligase auf der Oberfläche von pMB-03- sowie pMB-04-tragenden M13-Phagen.

4.1.2 Design und Konstruktion einer Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek

Die Herstellung der Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek erfolgte in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe "Künstliche Bindeproteine" der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Innerhalb dieser Arbeitsgruppe wurde ein modulares Design etabliert, welches die Generierung von DNA-Bibliotheken mit hoher Diversität und Funktionalität ermöglicht (vgl. 3.4.2, S. 68).

Für die Generierung einer Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek wurden die sechs Aminosäurepositionen H40, A55, K97, L99, S190 und Q192, welche sich im aktiven Zentrum von Trypsiligase befinden, für eine Randomisierung ausgewählt. In Abbildung 10 ist die strukturelle Lokalisation der Randomisierungspositionen anhand der Kristallstruktur von Trypsiligase dargestellt. Die Kriterien zur Auswahl dieser Aminosäurepositionen werden detailliert im Kapitel 5.2 (S. 136) diskutiert und umfassen im Wesentlichen vier Aspekte:

- i) Schaffung eines hydrophoben Clusters im Bereich des aktiven Zentrum zum Ausschluss eines Wassermoleküls als Konkurrenz-nukleophil (Positionen K97, L99, S190 und Q192)
- ii) Begünstigende Interaktion mit P-Bereich des Acyl donors (Positionen K97 und L99)
- iii) Verbesserung der Affinität zum peptidischen Acylakzeptor (Position H40)
- iv) Modulation der Hydrolyseaktivität des Biokatalysators (Position A55).

Das in dieser Arbeit verwendete modulare Design für Trypsiligase ist in Abbildung 7A (S. 69) schematisch dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung der durchgeführten Bibliothekskonstruktion findet sich in Kapitel 3.4.2 (S. 68). Im ersten Schritt der Bibliothekskonstruktion wurde das für Trypsiligase codierende Gen in vier konstante Fragmente (SF, IF1, IF2 und EF)

sowie vier randomisierte Fragmente (RF1-RF4) unterteilt. Letztere beinhalten jeweils ein bis zwei randomisierte Basentriplets, welche auf Proteinebene für die zu randomisierenden Aminosäurepositionen codieren. Für die Generierung der randomisierten Fragmente wurden zunächst Oligonukleotide durch die Firma Ella Biotech GmbH synthetisiert, wobei eine Trinukleotid-basierte Randomisierungsstrategie zum Einsatz kam. Hierbei wurde während der Oligonukleotidsynthese bei korrespondierenden Basentriplets eine definierte Mischung von Trinukleotid-Phosphoramiditen verwendet, welche für alle kanonischen Aminosäuren außer Cystein codieren. Bei sechs randomisierten Aminosäurepositionen ergibt sich eine theoretische Diversität auf DNA- sowie Proteinebene von $4,7 \times 10^7$ einzigartigen Trypsiligase-Varianten.

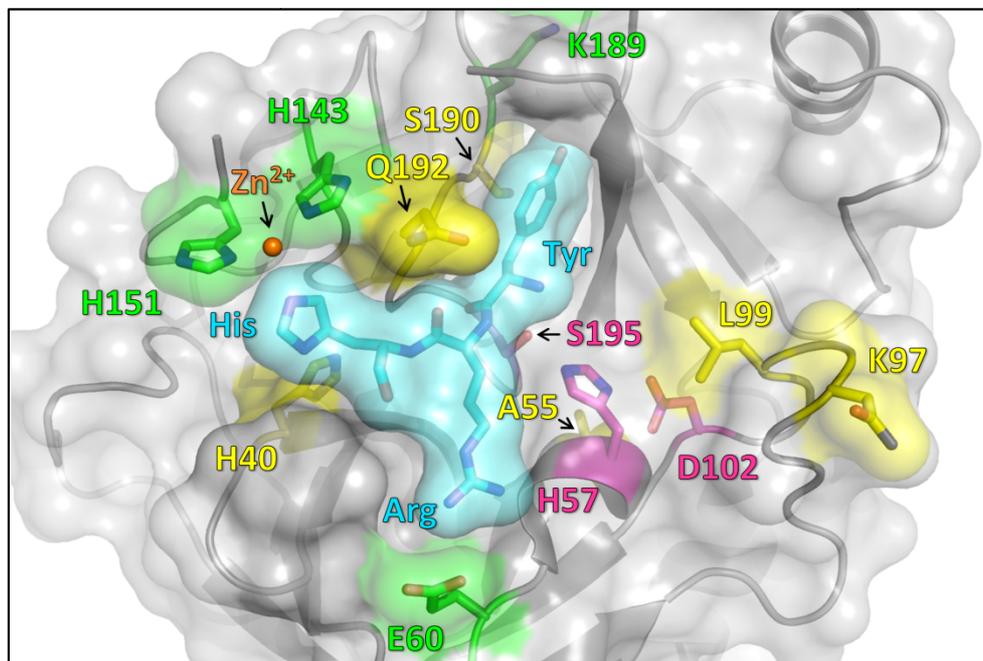


Abbildung 10: Darstellung des aktiven Zentrums von Trypsiligase mit eingebundenem Substrat sowie ausgewählten Randomisierungspositionen. Gezeigt ist die Oberflächendarstellung des aktiven Zentrums von Trypsiligase (PDB 4NIY) mit den vier Mutationen K60E, N143H, E151H und D189K (Stabdarstellung, grün), der katalytischen Triade D102-H57-S195 (Stabdarstellung, magenta) sowie dem eingebundenen YRH-Substrat (Stabdarstellung, cyan) mit komplexiertem Zinkion (Kugeldarstellung, braun). Desweiteren sind die für die Generierung einer Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek ausgewählten Aminosäurepositionen H40, A55, K97, L99, S190 sowie Q192 (Stabdarstellung, gelb) gezeigt.

Die einzelsträngigen Oligonukleotide wurden anschließend durch das Klenow-Fragment zum Doppelstrang aufgefüllt. Die Generierung der konstanten Fragmente erfolgte PCR-basiert. Um *frameshift*-Sequenzen zu reduzieren, welche in der finalen Bibliothek zu nicht funktionalen Proteinvarianten führen würden, wurde bei allen Fragmenten eine Leserahmenselektion durchgeführt.^[185] Das Prinzip der durchgeführten Leserahmenselektion wird ausführlich unter 3.4.2 (S. 68) erläutert. Durch eine sequenzielle Reassemblierung der selektierten Einzelfragmente konnte schließlich die finale DNA-Bibliothek erhalten werden.

Zur primären Beurteilung einer erfolgreichen Randomisierung entsprechender Aminosäurepositionen erfolgte eine Sequenzierung der mittels PCR amplifizierten DNA-Bibliothek. In dem in Abbildung 11A gezeigten Elektropherogramm der Sequenzierung lässt sich bei den sechs randomisierten Basentriplets eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale aller vier Basen feststellen, wohingegen flankierende Basentriplets distinkte Fluoreszenzsignale zeigen. Nun erfolgte die Klonierung der DNA-Bibliothek in den optimierten Phagemidvektor pMB-04 (vgl. 4.1.1, S. 87). Mit dem hieraus resultierenden Phagemiden pMB-04_LibMB erfolgte zunächst die Transformation von *E. coli* NEB-10beta-Zellen, welche eine sehr hohe Transformationseffizienz von $2 \cdot 10^{10}$ cfu/ μ g pUC19 besitzen. Mit $2,3 \times 10^8$ cfu konnte die Diversität der DNA-Bibliothek um den Faktor 4,9 abgedeckt werden. Nach einer sich anschließenden Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte die Transformation von *E. coli* ER2738-Zellen, welche im Rahmen der Selektion zur Herstellung Trypsiligase-präsentierender Phagen verwendet wurden. Hierbei konnte die Diversität der DNA-Bibliothek mit $8,2 \times 10^7$ cfu um den Faktor 1,7 abgedeckt werden.

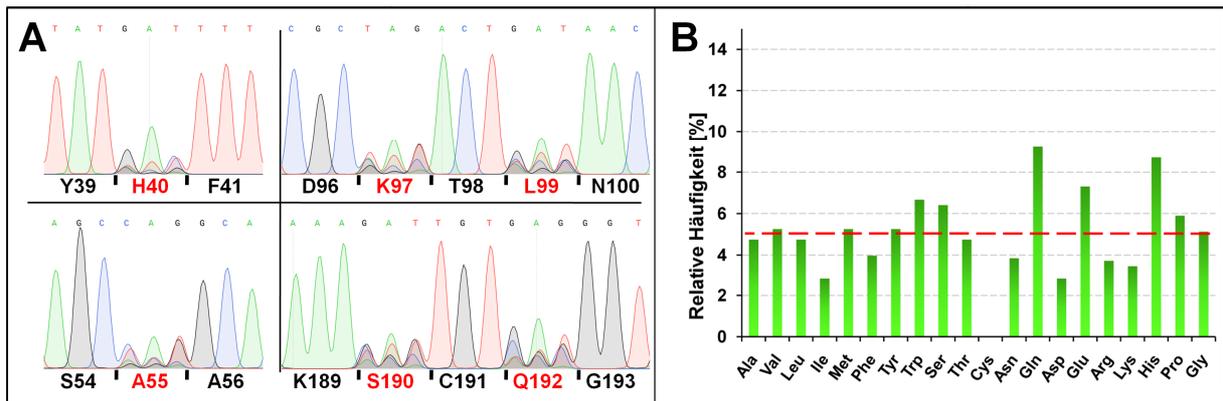


Abbildung 11: Übersicht zur quantitativen sowie qualitativen Analyse der Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek. A) Elektropherogramm der Sequenzierung der finalen DNA-Bibliothek, wobei die sechs randomisierten Basentriplets sowie deren flankierende Basentriplets gezeigt sind. B) Graphische Auswertung zur gemittelten Aminosäureverteilung an den sechs randomisierten Aminosäurepositionen. Hierzu wurden 130 einzigartige Trypsiligase-Varianten sequenziert und hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung an den randomisierten Positionen analysiert. Für die Auswertung wurden die relativen Häufigkeiten aller gefundenen Aminosäuren aufgetragen. Die rot gestrichelte Linie zeigt die theoretisch erwartete Häufigkeit von 5,3 % bei 19 zugelassenen Aminosäuren (Cystein wurde für die Randomisierung ausgeschlossen).

Es folgte eine Analyse zur Diversität und Funktionalität der finalen Bibliothek durch Sequenzierung von 143 einzelnen Bibliotheksvarianten. Hierbei zeigten lediglich sechs Varianten eine *frameshift*-Mutation innerhalb des ORF. Für die restlichen Varianten konnten bis auf die gewünschten Austausch an den sechs randomisierten Aminosäurepositionen keine zusätzlichen Mutationen beobachtet werden, wodurch sich für die Bibliothek eine apparente Funktionalität von 95,8 % auf DNA- und Proteinebene ergab.

Dies bestätigt die erfolgreiche Randomisierung der gewünschten Positionen sowie die hohe Qualität der DNA-Bibliothek. Desweiteren wurde die relative Häufigkeit der zugelassenen 19 Aminosäuren an den randomisierten Positionen analysiert. Da 7 der 137 funktionalen Enzymvarianten Signalüberlagerungen an den randomisierten Positionen zeigten (hierbei handelt es sich um transformierte *E. coli*-Zellen, welche über mindestens zwei Phagemide verfügten), wurden für die Verteilungsanalyse die verbleibenden 130 Sequenzen herangezogen. Wie in Abbildung 11B zu sehen ist, korrelierte hierbei die relative Häufigkeit aller eingebauten Aminosäuren in den randomisierten Positionen in guter Näherung mit der theoretischen Gleichverteilung von 5,3 %.

4.2 Selektion optimierter Trypsiligase-Varianten mittels Phagen-Display

Die Anreicherung verbesserter Biokatalysatoren innerhalb der Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek pMB-04_LibMB erfolgte durch eine Selektion mittels Phagen-Display. Die Generierung der naiven Phagenbibliothek, bei der Trypsiligase-Varianten monovalent auf der Oberfläche des Bakteriophagen M13 präsentiert werden, erfolgte wie unter 3.4.3 (S. 73) beschrieben. Für die Anreicherung potentiell verbesserter Biokatalysatoren wurden zwei Selektionen (im Weiteren als Selektion A und B bezeichnet) durchgeführt. Diese unterschieden sich hinsichtlich der Streptavidin-beschichteten magnetischen *beads*, welche zur Immobilisierung des *N*-terminal biotinylierten Peptidsubstrates (Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH, vgl. 2.8, S. 43) eingesetzt wurden. Für die Selektion A wurden M270-*beads* mit carboxylierter Oberfläche verwendet und für Selektion B kamen M280-*beads* mit tosylierter Oberfläche zum Einsatz. Bei beiden Selektionen wurden insgesamt vier Selektionsrunden (Abb. 5B, S. 30) durchgeführt, wobei der Selektionsdruck von Runde zu Runde erhöht wurde. Wie in Tabelle 21 (S. 76) aufgeführt, erfolgte die Steigerung der Selektionsstringenz durch eine sukzessive Reduzierung von Substratmenge und Nukleophilkonzentration, einer Erhöhung von Anzahl und Dauer der Waschschrte sowie durch eine Verkürzung der Elutionszeit. Die Durchführung der Selektion erfolgte wie unter 3.4.4 (S. 75) beschrieben. Hierbei erfolgte bei jeder Selektionsrunde die Bestimmung der Anzahl an Phagen aus dem letzten Waschschrte sowie dem Elutionsschrte, welche im Folgenden als Waschfraktion und Elutionsfraktion bezeichnet werden. Tabelle 23 zeigt eine Zusammenfassung der Quantifizierung aller Selektionsrunden für Selektion A und B.

Tabelle 23: Übersicht zur Quantifizierung der Phagen innerhalb der letzten Waschfraktion (WF) sowie Elutionsfraktion (EF) aus den einzelnen Runden der Selektion A und B.

Selektionsrunde	Phagenanzahl input (cfu)	Phagenanzahl WF (cfu)	Phagenanzahl EF (cfu)	Verhältnis EF:WF
Selektion A				
1 (5 x waschen)	$1,0 \times 10^{11}$	$3,0 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	1,4
2 (8 x waschen)	$1,5 \times 10^{11}$	$5,7 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	1,1
3 (10 x waschen)	$3,0 \times 10^{11}$	$6,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	0,4
4 (12 x waschen)	$0,8 \times 10^{11}$	$1,7 \times 10^4$	$5,0 \times 10^3$	0,3
Selektion B				
1 (5 x waschen)	$1,0 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$	2,8
2 (8 x waschen)	$1,8 \times 10^{11}$	$6,5 \times 10^6$	$8,8 \times 10^6$	1,4
3 (10 x waschen)	$3,7 \times 10^{11}$	$9,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	0,7
4 (12 x waschen)	$0,8 \times 10^{11}$	$2,4 \times 10^6$	$5,5 \times 10^5$	0,2

4.3 Identifizierung optimierter Trypsiligase-Varianten

Auf Basis der Selektion sollten potentiell optimierte Trypsiligase-Varianten, welche durch eine gerichtete Evolution mittels Phagen-Display angereichert wurden, identifiziert werden. Hierzu sollte zunächst ein *ELISA*-basiertes Hochdurchsatz-Screening im Mikrotiterplattenformat etabliert werden, welches die Untersuchung einer Vielzahl von selektierten Trypsiligase-Varianten hinsichtlich ihrer Syntheseeffizienz erlaubt.

4.3.1 Etablierung eines *ELISA*-basierten Screeningsystems

Grundlage für die Durchmusterung einer Vielzahl potentieller Biokatalysatoren war zunächst deren Herstellung im 96-well Mikrotiterplattenformat. Hierzu wurden ausführliche Studien mit *Pichia pastoris* als Expressionssystem sowie der nativen Trypsiligase als Zielprotein angefertigt (R. WARTNER, AG BORDUSA, MLU Halle-Wittenberg). Für die Etablierung des sich anschließenden *ELISA*-basierten *readout*-Systems ergaben sich folgende Anforderungen:

- (i) Durchführbarkeit im Mikrotiterplattenformat, um eine möglichst große Anzahl an Biokatalysatoren durchmusteren zu können und
- (ii) es soll die Messung des zeitlichen Verlaufs der Bildung des Transamidierungsproduktes ermöglichen, um Biokatalysatoren identifizieren zu können, welche eine verbesserte Syntheseeffizienz bei geringen Substratkonzentrationen zeigen.

Nach einem arbeitsgruppeninternen Protokoll (Forschungsbericht von R. WARTNER, AG BORDUSA, MLU Halle-Wittenberg) wurde die native Trypsilgase mittels *P. pastoris* im 96-*deepwell*-Format hergestellt. Für eine vollständige Aktivität des in den Überstand sekretierten Proteins war ein Umpufferungsschritt nötig. Im umgepufferten Überstand konnte für Trypsilgase eine Konzentration zwischen 0,5-1 μM erreicht werden. Für die Etablierung der Transamidierungsreaktion im 96-*well*-Format wurde daher eine finale Enzymkonzentration von 0,5 μM im Ansatz gewählt.

Für das *ELISA*-basierte *readout*-System wurden zwei Teilschritte etabliert, eine enzymkatalysierte Transamidierungsreaktion im 96-*well*-Mikrotiterplattenformat sowie die Detektion des gebildeten Transamidierungsproduktes durch einen nachfolgenden *ELISA* im 384-*well*-Format. Der genaue Ablauf des *ELISA*-basierten Hochdurchsatz-Screenings ist schematisch in Abbildung 8 (S. 79) dargestellt. Für die im ersten Teilschritt durchgeführte Transamidierungsreaktion kamen folgende Peptide zum Einsatz:

- (i) ein *N*-terminal biotinyliertes Substrat (Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH, im Folgenden als Peptidsubstrat bezeichnet), welches mit der Erkennungssequenz von Trypsilgase (YRH) ausgestattet war, sowie
- (ii) ein Nukleophil (H-RHAAGEEQKLISEEDL-OH, unterstrichene Sequenz entspricht dem cMyc-tag), welches *N*-terminal über ein RH-Motiv verfügte und *C*-terminal mit einem cMyc tag ausgestattet war.

Im Zuge der in Lösung katalysierten Transamidierungsreaktion im 96-*well*-Format entstanden neben dem Hydrolyseprodukt (Biotin-PEG-GAAY-OH) auch das Aminolyseprodukt (Biotin-PEG-GAAYRHAAGEQKLISEEDL-OH), welches *C*-terminal mit einem cMyc-tag ausgestattet ist. Nach Immobilisierung der im Reaktionsansatz befindlichen biotinylierten Peptide (dies sind Peptidsubstrat sowie Aminolyse- und Hydrolyseprodukt) auf einer Streptavidin-beschichteten Oberfläche kann die Menge an Aminolyseprodukt mit *C*-terminalem cMyc-tag durch einen cMyc-tag spezifischen Antikörper in einem nachfolgenden *ELISA* quantifiziert werden.

Das Ziel war es auch, den zeitlichen Verlauf der Bildung des Aminolyseproduktes verfolgen zu können. Hierzu musste die Transamidierungsreaktion zu mehreren distinkten Zeitpunkten terminiert werden, wobei möglichst die initiale Phase der Produktbildung, das Produktmaximum und gegebenenfalls dessen Sekundärhydrolyse erfasst werden sollten. Zur Termination der Transamidierungsreaktion hat sich der Transfer eines Aliquotes des Reaktionsansatzes in eine separate 96-*well*-Mikrotiterplatte, welche zuvor mit Abstopppuffer (vgl. 2.2, S. 35) beschickt wurde, als geeignet erwiesen. Desweiteren sollte die Transamidierung im 96-*well*

Format mit einer niedrigen Substratkonzentration durchgeführt werden. Dies ermöglicht eine bessere Identifizierung effizienter Biokatalysatoren, da Trypsiligase, welche als Referenz dienen sollte, bei niedrigen Substratkonzentrationen verminderte Produktausbeuten zeigt.

In Abbildung 12 sind beispielhaft zwei Progresskurven der Trypsiligase-katalysierten Produktbildung gezeigt, welche mit 50 μM und 25 μM Peptidsubstrat sowie 2 Äquivalenten Nukleophil erhalten wurden. Hieraus wurde eine Substratkonzentration von 25 μM mit 2 Äquivalenten Nukleophil als geeignet abgeleitet. Für das Hochdurchsatz-Screening sollte die Transamidierungsreaktion im 96-well Format (mit jeweils einer Trypsiligase-Variante je Kavität) durchgeführt werden. Unter Einbeziehung der Progresskurve in Abbildung 12 wird die Termination der Reaktion bei 5, 30, 60 und 150 Minuten erfolgen. Die Durchführung des *ELISA* erfolgt im 384-well-Format mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten zur Immobilisierung der biotinylierten Peptide, wobei das Transamidierungsprodukt im nachfolgenden *ELISA* quantifiziert wird.

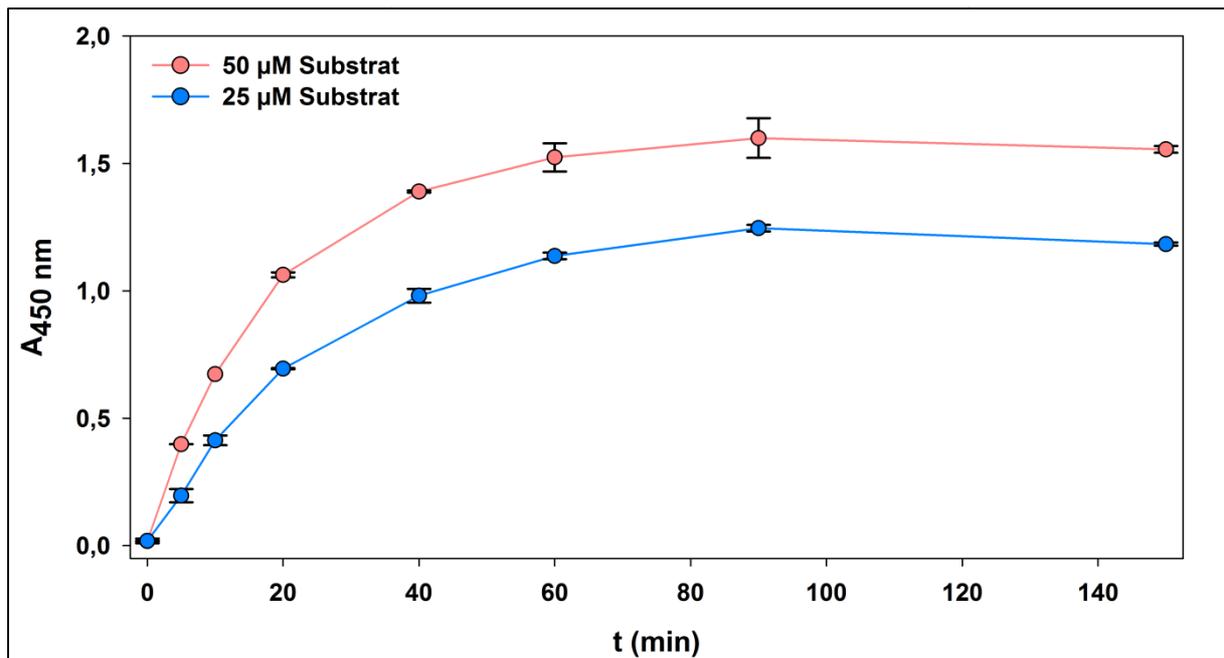


Abbildung 12: Validierung des *ELISA*-basierten Screeningsystems im Hochdurchsatzformat. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf einer durch Trypsiligase-katalysierten Transamidierungsreaktion, wobei das biotinylierte Peptidsubstrat Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH mit einem cMyc-tag modifiziert wurde. Die Quantifizierung erfolgte mittels *ELISA* im 96-well Mikrotiterplattenformat, wobei der cMyc-tag des Aminolyseproduktes durch einen cMyc-spezifischen Antikörper detektiert wurde. Reaktionsbedingungen: 0,5 μM Trypsiligase, 25/50 μM Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH, 2 Äquivalente H-RHAAGEQKLISEEDL-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 100 μM ZnCl_2 , pH 7,8 bei $T = 30^\circ\text{C}$. Alle aufgetragenen Meßwerte stellen den Mittelwert zweier unabhängig durchgeführten Messungen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittlere absolute Abweichung.

Es konnte somit erfolgreich ein *ELISA*-basiertes Screeningsystem etabliert werden, welches mit vier Messpunkten zu unterschiedlichen Reaktionszeiten der Transamidierungsreaktion die

Aufnahme von Progresskurven im Mikrotiterplattenformat ermöglicht. Hierdurch können in kurzer Zeit für eine Vielzahl von individuellen Biokatalysatoren vergleichende Informationen hinsichtlich der Geschwindigkeit der Produktbildung, der maximalen Produktausbeute sowie der Stabilität des Produktes generiert werden.

4.3.2 Screening selektierter Biokatalysatoren im Hochdurchsatz

Der *pool* angereicherter Trypsiligase-Varianten aus der vierten Selektionsrunde von Selektion A und B sollte hinsichtlich optimierter Biokatalysatoren durchgemustert werden. Hierzu wurde das in dieser Arbeit etablierte Hochdurchsatz-Screening (vgl. 4.3.1, S. 94) eingesetzt. Wie unter 3.4.4 (S. 75) beschrieben, wurden zur Vorbereitung des Screenings die Phagemide der eluierten Phagen aus Selektionsrunde vier isoliert. Die auf den Phagemiden lokalisierten Gensequenzen angereicherter Trypsiligase-Varianten wurden mittels PCR amplifiziert und anschließend in den Expressionsvektor pPICZαA kloniert. Zur Herstellung von Einzelvarianten im Hochdurchsatzformat erfolgte die Transformation in *P. pastoris* X33-Zellen. Nach dem Ausstreichen auf Q-Tray-Platten wurden einzelne *P. pastoris*-Kolonien durch das Koloniepicker-System QPix2 in 96-*deepwell*-Mikrotiterplatten überführt. Für Selektionen A und B wurden jeweils 368 Einzelvarianten durchgemustert. Als Referenzenzym wurde die native Trypsiligase in zwei Kavitäten je 96-*well*-Mikrotiterplatte mitgeführt. Die Herstellung der Einzelvarianten sowie die detaillierte Durchführung des *ELISA*-basierten Screenings erfolgte wie unter 3.5 (S. 77) beschrieben. In Abbildung 13 sind die Progresskurven aller 736 gemessenen Einzelvarianten sowie der nativen Trypsiligase dargestellt.

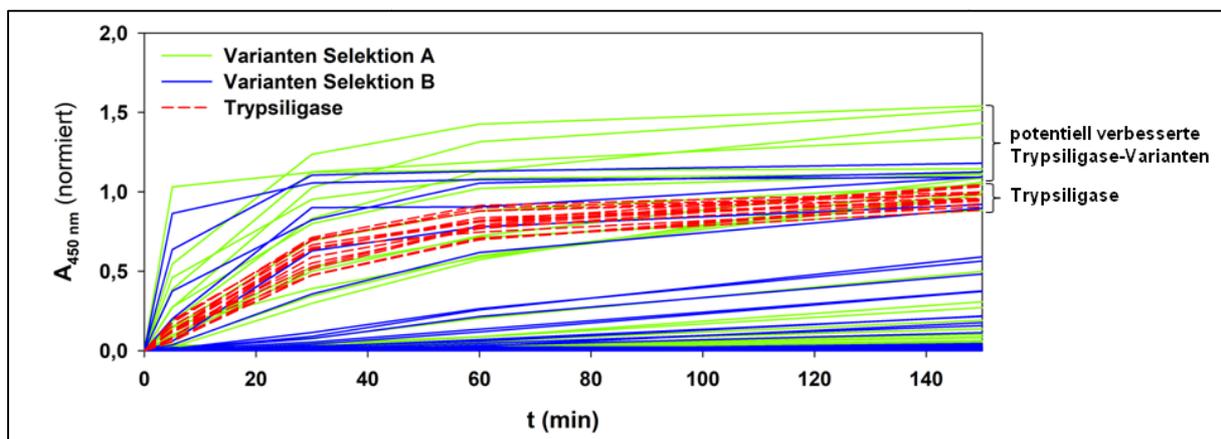


Abbildung 13: Graphische Auswertung zum *ELISA*-basierten Screening im Hochdurchsatz. Gezeigt sind Progresskurven von 768 selektierten Einzelvarianten aus der vierten Selektionsrunde von Selektion A und B (jeweils 368 Trypsiligase-Varianten). Durch einen Vergleich mit der nativen Trypsiligase (rot gestrichelte Kurven) konnten 16 potentiell verbesserte Trypsiligase-Varianten identifiziert werden.

Hierbei konnten insgesamt 16 potentiell verbesserte Trypsiligase-Varianten identifiziert werden, welche eine ähnliche oder gesteigerte Produktausbeute im Vergleich zur nativen Trypsiligase zeigten. Dabei stammten 11 Varianten aus Selektion A und 5 aus Selektion B. Alle identifizierten Varianten wurden im Weiteren genauer analysiert. Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur der Enzymvarianten beinhaltet Informationen zur Nummer der Mikrotiterplatte sowie der Kavität, in welcher sich die entsprechende Kryokultur befand (vgl. 3.5, S. 77). So befand sich beispielsweise Trypsiligase-Variante 2G10 auf Platte 2, in Kavität G10.

4.4 Charakterisierung identifizierter Trypsiligase-Varianten

Die im Hochdurchsatz-Screening identifizierten Trypsiligase-Varianten sollten zunächst hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz analysiert werden. Fortführend sollten funktionale Varianten für eine primäre enzymkinetische Charakterisierung rekombinant hergestellt und gereinigt werden.

4.4.1 Sequenzierung identifizierter Trypsiligase-Varianten

Für die Sequenzierung der identifizierten Trypsiligase-Varianten wurde zunächst die auf dem Genom lokalisierte Gensequenz mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden Zellen einer *P. pastoris*-Kolonie direkt in den PCR-Ansatz eingetragen, wobei die genomische DNA als *template* diente. Nach Amplifikation der Gensequenzen mittels der *primer* pIB4_seq_fwd und 4xTn_pPICZalpha_rev erfolgte deren Reinigung durch eine präparative Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 3.1.4, S. 51). Anschließend erfolgte die Sequenzierung der gereinigten DNA-Fragmente (vgl. 3.1.9, S. 53).

Die Sequenzanalysen für die sechs randomisierten Positionen aller identifizierten Varianten sind in Tabelle 25 (vgl. 4.4.3, S. 102) zusammengefasst und der nativen Sequenz von Trypsiligase gegenübergestellt. Bei drei der elf Biokatalysatoren aus Selektion A handelte es sich um *multicopy*-Variante, bei denen die Gensequenzen von mindestens zwei selektierten Trypsiligase-Varianten in das Genom von *P. pastoris* integriert wurden. Dies zeigte sich anhand von Signalüberlagerungen mehrerer Basen innerhalb der randomisierten Positionen, wodurch bei diesen Varianten nicht alle Mutationen aufgeklärt werden konnten. Es erfolgte keine weiterführende Charakterisierung für diese Trypsiligase-Varianten. Unter den acht verbleibenden Trypsiligase-Varianten zeigten mehrere eine identische Sequenz. So wurden die Mutationen der Variante 3A11 fünfmal gefunden und die Mutationen der Variante 4H3 zweimal. Trypsi-

ligase-Variante 2D8 zeigte eine einzigartige Sequenz. Innerhalb der Selektion B zeigten alle fünf identifizierten Biokatalysatoren einzigartige Sequenzen, wobei eine Sequenz identisch mit der von Trypsiligase-Variante 3A11 aus Selektion A war.

4.4.2 Präparative Herstellung ausgewählter Trypsiligase-Varianten

Im Folgenden wurden die sieben sequenzierten Trypsiligase-Varianten für eine detaillierte Beurteilung ihres synthetischen Potentials rekombinant hergestellt und gereinigt. Wie beim Hochdurchsatz-Screening erfolgte die rekombinante Herstellung der Biokatalysatoren in *P. pastoris* X33, jedoch im präparativen Maßstab (vgl. 3.2.2.4, S. 58). Zur Inokulation und Anzucht von Expressionskulturen konnten die im Screening angelegten Glycerinkulturen der entsprechenden Trypsiligase-Varianten (vgl. 3.5, S. 77) verwendet werden. Nach einer fünftägigen Expression wurden die in den Kulturüberstand sezernierten Trypsiligase-Varianten durch ein chromatographisches Zweischrittreinigungsverfahren zur Homogenität gereinigt. Dieses bestand aus einer Kationenaustauschchromatographie (vgl. 3.3.1.1, S. 59) sowie einer nachfolgenden Größenausschlusschromatographie (vgl. 3.3.1.2, S. 59). Beispielhaft hierfür ist der Reinigungsverlauf der Trypsiligase-Variante 2G10 in Abbildung 14 dargestellt. Der im Kulturüberstand befindliche Biokatalysator wurde zunächst durch eine Kationenaustauschchromatographie isoliert und konzentriert (Abb. 14A). In der sich anschließenden Größenausschlusschromatographie konnte die monomere und homogene Enzymspezies bei einem Elutionsvolumen von ca. 70-80 ml von multimeren Spezies sowie Aggregaten abgetrennt werden (Abb. 14B).

Zur Beurteilung des Reinigungsverlaufes wurde eine Analyse mittels reduzierender SDS-PAGE durchgeführt (Abb. 14C). So konnte in allen aufgetragenen Fraktionen der Kationenaustausch- sowie Größenausschlusschromatographie eine distinkte Proteinbande bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 24 kDa ausgemacht werden, welche der Trypsiligase-Variante 2G10 zugeordnet werden konnte. Zudem ist in Fraktion 18 der Größenausschlusschromatographie eine Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 25 kDa zu beobachten. Hierbei könnte es sich um eine unprozessierte Enzymspezies mit intaktem α -mating-Faktor handeln. Resultierend hieraus wurden die Fraktionen 19-22 der Größenausschlusschromatographie vereinigt und konzentriert. Die hohe Reinheit und Identität der präparierten Enzymspezies wurde durch eine massenspektrometrische Analyse bestätigt (Abb. 14D).

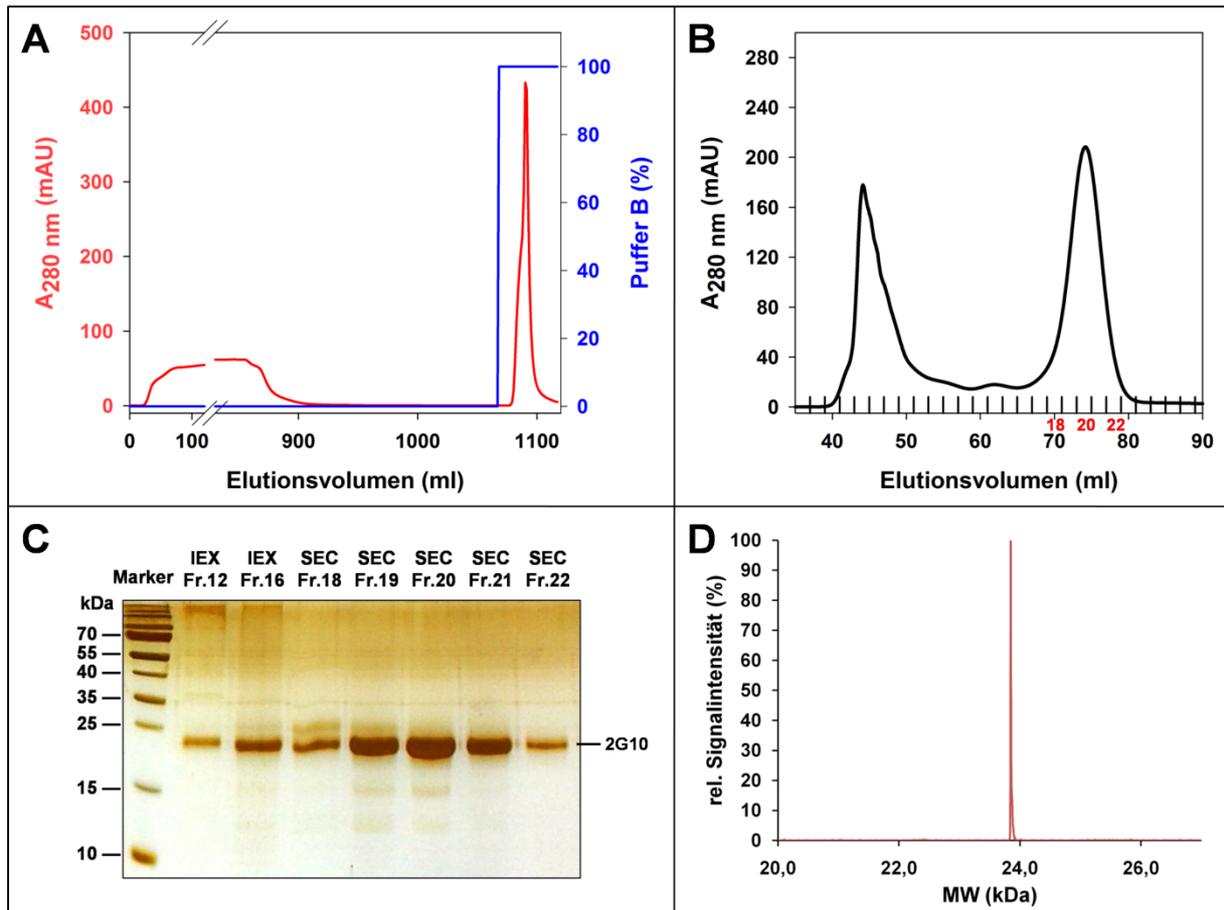


Abbildung 14: Übersicht zum Reinigungsverlauf der Trypsiligase-Variante 2G10. **A)** Isolierung und Konzentrierung der Trypsiligase-Variante 2G10 im ersten Reinigungsschritt mittels Kationenaustauschchromatographie. **B)** Zweiter Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie mit Fraktionierung des Elutionspeaks (Fraktion 18-22, rot). **C)** SDS-PAGE-Analyse der Zweischrittreinigung von Trypsiligase-Variante 2G10. IEX: Kationenaustauschchromatographie; SEC: Größenausschlusschromatographie. Detektion mittels Silberfärbung **D)** LC-MS Analyse von Trypsiligase-Variante 2G10 nach Reinigung ($M_{\text{ber.}}$: 23840,8 Da; $M_{\text{gef.}}$: 23839 ± 1 Da).

Der hohe Anteil an Aggregaten, welcher im Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie bei einem Elutionsvolumen von ca. 40-50 ml ersichtlich ist, konnte auch bei allen anderen rekombinant hergestellten Trypsiligase-Varianten sowie der nativen Trypsiligase beobachtet werden (vgl. Abb. A10, S. 182).

Trypsiligase-Variante 2G10 konnte mit einer Ausbeute von 11 mg je Liter Kulturvolumen erhalten werden. In Tabelle 24 sind die Ausbeuten aller rekombinant hergestellten Enzymvarianten sowie von Trypsiligase zusammengefasst.

Tabelle 24: Übersicht zur Ausbeute von rekombinant hergestellten und gereinigten Trypsiligase-Varianten in mg je Liter Kulturvolumen.

Variante	Trypsiligase	2D8	3A11	4H3	1B8	2G10	4B5	4E10
Ausbeute (mg/l)	14,3	1,9	6,1	0,8	5,7	11,0	8,1	12,2

4.4.3 Primäre enzymkinetische Charakterisierung ausgewählter Trypsiligase-Varianten

Zur initialen Beurteilung des synthetischen Potentials aller gereinigten Trypsiligase-Varianten wurde eine Transamidierungsreaktion mit Modellsubstraten durchgeführt. In Analogie zur Selektion und zum Screening wurde als Modellsubstrat Bz-AA_YRHAAG-OH und als Nukleophil H-RHAAGEQKLISEEDL-OH verwendet (vgl. 3.6.2, S. 82). Hinsichtlich der enzymkatalysierten Reaktion wurden neben der maximalen Ausbeute an Aminolyseprodukt auch die apparenten Wechselzahlen der Aminolyse- sowie Hydrolysereaktion ermittelt (Tab. 25). Die Transamidierungsreaktion wurde bei einer Substratkonzentration von 250 μM sowie einem zweifachen Überschuss an Nukleophil (500 μM) durchgeführt. Unter der Annahme, dass keine Hydrolyse von Substrat und Produkt stattfinden, ergibt sich aus diesem molaren Verhältnis der Abgangsgruppe des Substrates (kann erneut als Nukleophil agieren) zu extern hinzugegebenem Peptidnukleophil im thermodynamischen Gleichgewicht eine theoretisch maximal erreichbare Ausbeute von 66,7 %.

Zunächst wurde die native Trypsiligase als Referenzenzym gemessen. Diese erreicht unter den genannten Reaktionsbedingungen eine maximale Ausbeute an Aminolyseprodukt von 38,1 % mit einer apparenten Wechselzahl für die Aminolysereaktion von 0,034 s^{-1} . Mit einer apparenten Wechselzahl von 0,007 s^{-1} verläuft die konkurrierende Hydrolysereaktion um den Faktor 4,7 langsamer. Im Vergleich zu Trypsiligase zeigten alle im Screening identifizierten Trypsiligase-Varianten eine um den Faktor 1,1 bis 1,5 gesteigerte Ausbeute an Aminolyseprodukt. Maßgeblich hierfür scheint ein verbessertes Verhältnis von Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit zu sein, welches bei allen Varianten beobachtet werden konnte. So ergaben sich hierbei Faktoren von 8,9 bis 47,7, während die native Trypsiligase lediglich einen Faktor von 4,7 erreichte.

Dies ergab sich im Wesentlichen durch eine verminderte Hydrolyseaktivität seitens der Trypsiligase-Varianten. So zeigt beispielsweise Trypsiligase-Variante 2G10 zwar eine mit Trypsiligase vergleichbare apparente Wechselzahl für die Aminolyse von 0,032 s^{-1} , die apparente Wechselzahl der konkurrierende Hydrolysereaktion lag jedoch mit 0,0007 s^{-1} um eine Größenordnung niedriger. Diese verminderte Hydrolyseaktivität bedingt eine beachtliche Ausbeutesteigerung, welche mit 58,1 % nahezu im Bereich der theoretisch erreichbaren Maximalausbeute von 66,7 % liegt. Zudem zeigten die zwei Varianten 2D8 und 4H3 eine mit Trypsiligase vergleichbare Hydrolyseaktivität von 0,0082 s^{-1} respektive 0,0075 s^{-1} . Die Wechselzahl der Aminolysereaktion war jedoch um den Faktor 2 bis 3 erhöht, was wiederum zu

einer erhöhten Ausbeute an Aminolyseprodukt führte. Resultierend aus der primären Analyse des synthetischen Potentials aller identifizierten Enzymvarianten (vgl. Tab. 25) wurde Trypsiligase-Variante 2G10 aufgrund der höchsten Ausbeute an Aminolyseprodukt bei moderater Katalysegeschwindigkeit als vielversprechendster Biokatalysator befunden und sollte detailliert in fortführenden Arbeiten charakterisiert werden.

Tabelle 25: Übersicht zur primären Analyse der identifizierten Biokatalysatoren hinsichtlich Aminosäuresequenz und Syntheseeffizienz. Reaktionsbedingungen: 2,5-40 μM Enzymvariante, 250 μM Bz-AAYRHAAG-OH, 500 μM H-RHAAGEQKLISEEDL-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 100 μM ZnCl_2 , pH 7,8 bei $T = 30^\circ\text{C}$. AL: Aminolyse, HL: Hydrolyse, n.b.: nicht bestimmbar, †: Variante aus Selektion A, ‡: Variante aus Selektion B, †‡: Sequenz wurde in Selektion A und B gefunden, *: Sequenz wurde fünfmal gefunden, **: Sequenz wurde zweimal gefunden.

Variante	Sequenzen randomisierter Positionen						Primäre enzymatische Charakterisierung			
	P-40	P-55	P-97	P-99	P-190	P-192	max. Ausbeute (%)	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ AL (s^{-1})	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ HL (s^{-1})	$k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ AL : $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ HL
Trypsiligase	H	A	K	L	S	Q	38,1	0,0338	0,0071	4,7
2G10 [†]	P	S	D	F	S	E	58,1	0,0315	0,0007	47,7
4E10 [†]	P	S	H	F	T	I	51,3	0,0031	0,0002	20,5
4B5 [‡]	N	T	F	Y	A	P	50,2	0,0153	0,0006	24,3
2D8 [†]	N	V	W	Y	S	E	46,5	0,0973	0,0082	11,8
3A11 ^{†‡}	N	A	W	F	S	G	45,0	0,0179	0,0020	8,9
4H3 ^{†**}	S	A	W	W	A	D	44,8	0,0712	0,0075	9,4
1B8 [‡]	I	S	D	F	V	Y	43,5	0,0140	0,0009	15,8
1G1 [†]	N/L/Q/I/M	A/P/T	W	F/V	V	Y/W	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
4B10 [†]	N/K	A/S/Y/D	W/Y/D	F/Y	V/M	D/Y/F	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
4F6 [†]	S/F	A	W/Y/Q	W/Y/N	S/A/Y/D	D/N/M/I	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

4.5 Detaillierte Charakterisierung der Trypsiligase-Variante 2G10

Als Grundlage für eine mögliche praxisorientierte Verwendung von Trypsiligase-Variante 2G10 zur Modifizierung therapeutisch relevanter Proteine, wie beispielsweise Antikörper oder deren Fragmente, sollte eine detaillierte Charakterisierung für Trypsiligase-Variante 2G10 hinsichtlich enzymkinetischer Eigenschaften durchgeführt werden. Dies umfasste im Wesentlichen Untersuchungen zur Enzymspezifität, zur pH- und Temperaturabhängigkeit sowie einer detaillierten Betrachtung der enzymkatalysierten Transamidierungsreaktion.

4.5.1 Untersuchungen zur Enzymspezifität

Zunächst sollte untersucht werden, ob sich durch die eingeführten Mutationen die Spezifität der Trypsiligase-Variante 2G10 für die Erkennungssequenz YRH im Vergleich zur nativen Trypsiligase verändert hat. Hierzu wurden Hydrolysestudien mit einer Bibliothek von

Peptidsubstraten mit der allgemeinen Sequenz Bz-AAX_{aa1}X_{aa2}X_{aa3}AAG-OH durchgeführt, bei denen jeweils die Aminosäuren in der P1 (X_{aa1}), P1' (X_{aa2}) sowie P2' (X_{aa3})-Position variiert wurden (vgl. 3.6.1, S. 80). Zur primären Diskriminierung potentieller Erkennungssequenzen wurden die apparenten Wechselzahlen der Hydrolysereaktion für die verschiedenen Peptidsubstrate bei einer konstanten Substratkonzentration von 1 mM gemessen (Abb. 15A). Die hierbei erhaltenen Ergebnisse waren mit der nativen Trypsiligase vergleichbar.^[154]

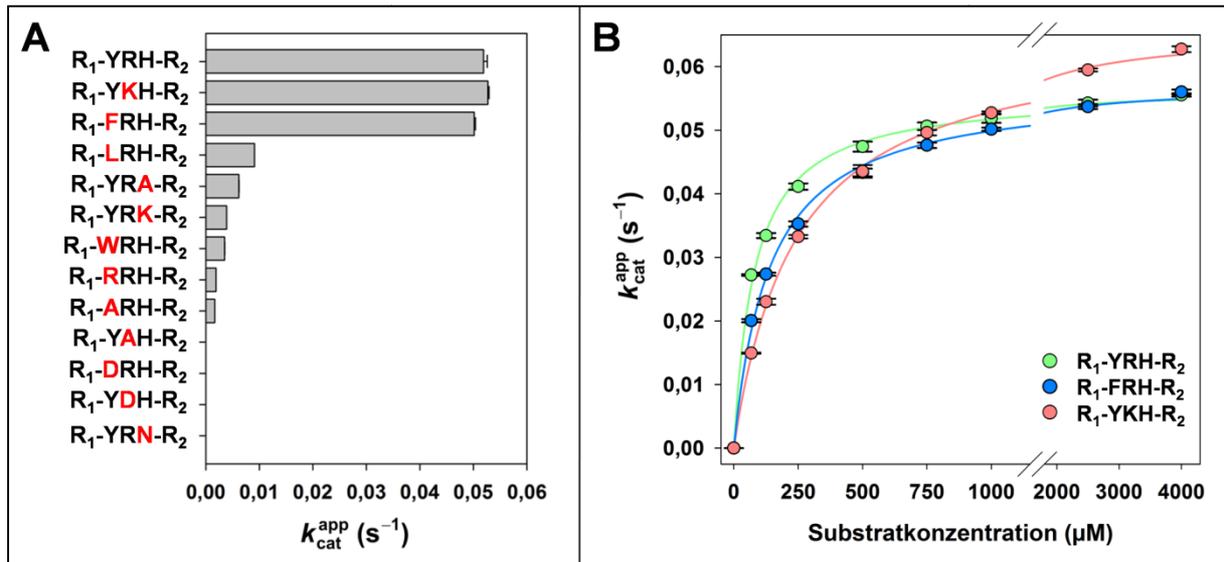


Abbildung 15: Ermittlung der spezifischen Erkennungssequenz für Trypsiligase-Variante 2G10. A) Bestimmung der spezifischen Hydrolyseaktivität von Trypsiligase-Variante 2G10 gegenüber Peptidsubstraten mit variierenden Aminosäuren in der P1-, P1'- sowie P2'-Position. Reaktionsbedingungen: 1-5 μM Trypsiligase-Variante 2G10, 1000 μM Bz-AAX_{aa1}X_{aa2}X_{aa3}AAG-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μM ZnCl₂, pH 7,8 bei T = 30 °C. B) Bestimmung der apparenten Wechselzahlen für die Hydrolyse ausgewählter Peptidsubstrate bei variierender Substratkonzentration. Die Messwerte wurden als Funktion der Substratkonzentration aufgetragen und durch eine nichtlineare Regression erfolgte die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter K_m und $k_{cat, HL}$, welche in Tabelle 26 zusammengefasst sind. Reaktionsbedingungen: 0,2-0,5 μM Trypsiligase-Variante 2G10, 67,5-5000 μM Bz-AAX_{aa1}X_{aa2}X_{aa3}AAG-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μM ZnCl₂, pH 7,8 bei T = 30 °C. R₁: Bz-AA; R₂: AAG-OH. Alle aufgetragenen Wechselzahlen stellen den Mittelwert zweier unabhängig durchgeführter Messreihen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Anstiegs aus der Geradengleichung der linearen Regressionsanalyse der Progresskurven.

Es zeigte sich für die P2'-Position, dass eine Substitution des Histidins sowohl durch eine polare, unpolare oder geladene Aminosäure zu einer starken Verminderung der Hydrolysegeschwindigkeit führt. Die für Trypsiligase beschriebene Präferenz für eine basische Aminosäure in der P1'-Position zeigt sich ebenfalls für Trypsiligase-Variante 2G10. Ein Austausch des Arginins in dieser Position gegen eine unpolare oder saure Aminosäure führte zum vollständigen Aktivitätsverlust, wohingegen für das Peptid mit der Erkennungssequenz YKH eine vergleichbare apparente Wechselzahl ermittelt werden konnte. In der P1-Position zeigte sich eine vergleichbar gute Akzeptanz für die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin. Eine Substitution des Tyrosins zum Tryptophan führte hingegen zu einer Verminderung

der Hydrolyseaktivität um eine Größenordnung. Auch ein Austausch zu einer Aminosäure mit aliphatisch unpolarer (Leu, Ala) oder geladener Seitenkette führte zu einer drastischen Verminderung der Enzymaktivität. So ergaben sich für die drei Peptide mit den Erkennungssequenzen YRH, YKH und FRH die höchsten spezifischen Hydrolyseaktivitäten. Für diese wurden die enzymkinetischen Parameter K_m und k_{cat} in einem Folgeexperiment ermittelt (Abb. 15B).

Wie in Tabelle 26 ersichtlich ist, zeigte Trypsiligase-Variante 2G10 mit $689 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ die höchste katalytische Effizienz für das Substrat mit der Erkennungssequenz YRH, gefolgt von FRH mit $407 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ sowie YKH mit $273 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$. Die Verringerung der katalytischen Effizienz für die FRH- sowie YKH-Sequenz ergibt sich bei einem vergleichbaren k_{cat} -Wert im Wesentlichen aus einer Erhöhung des K_m -Wertes von $80,0 \mu\text{M}$ (für YRH) auf $139,3 \mu\text{M}$ (für FRH) respektive $240,7 \mu\text{M}$ (für YKH). Somit zeigte Trypsiligase-Variante 2G10 die höchste Spezifität für die Erkennungssequenz YRH.

Tabelle 26: Zusammenfassung enzymkinetischer Parameter für die Hydrolyse diverser Peptidsubstrate durch die Trypsiligase-Variante 2G10 sowie Trypsiligase. HL: Hydrolysereaktion

Substrat	Trypsiligase-Variante 2G10			Trypsiligase ^[129]		
	K_m (μM)	$k_{cat, HL}$ (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$)	K_m (μM)	$k_{cat, HL}$ (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$)
R ₁ -YRH-R ₂	$80,0 \pm 4,3$	$0,056 \pm 0,001$	698	800	0,27	337
R ₁ -FRH-R ₂	$139,3 \pm 7,4$	$0,057 \pm 0,001$	407	2900	0,26	89
R ₁ -YKH-R ₂	$240,7 \pm 6,5$	$0,065 \pm 0,001$	273	1800	0,27	150

Dieser Befund korreliert mit der Spezifität der nativen Trypsiligase, bei der die katalytische Effizienz für YKH jedoch höher ist als für FRH. Beim Vergleich der enzymkinetischen Parameter von Trypsiligase-Variante 2G10 und Trypsiligase für die Erkennungssequenz YRH zeigt sich, dass (i) der K_m -Wert bei Trypsiligase-Variante 2G10 um den Faktor 10 erniedrigt ist, was in erster Näherung mit einer Erhöhung der Affinität zum Substrat um den Faktor 10 korreliert und (ii) der k_{cat} -Wert für die Hydrolysereaktion um den Faktor 5 erniedrigt ist.

4.5.2 Untersuchungen zur Abhängigkeit der Transamidierungsreaktion von der Nukleophilkonzentration

Im Rahmen der Hydrolysestudien konnte gezeigt werden, dass Trypsiligase-Variante 2G10 die höchste Spezifität gegenüber der Erkennungssequenz YRH aufweist. Hierbei konnten für

die Hydrolyse des Substrates Bz-AAyrHAAG-OH eine Katalysekonstante von $0,056 \text{ s}^{-1}$ sowie ein K_m -Wert von $80 \mu\text{M}$ bestimmt werden. In einer weiteren Studie sollten die enzymkinetischen Parameter der durch Trypsiligase-Variante 2G10 katalysierten Transamidierungsreaktion in Anwesenheit eines peptidischen Nucleophils (Acylakzeptor) bestimmt werden (vgl. 3.6.2, S. 82). Für die Messungen wurde das Substrat Bz-AAyrHAAG-OH als Acyldonor sowie das peptidische Nucleophil H-RHAK-OH als Acylakzeptor eingesetzt. Die verwendete Substratkonzentration entsprach mit $80 \mu\text{M}$ dem zuvor bestimmten K_m -Wert und wurde bei allen Messungen konstant gehalten. Die Messungen für Trypsiligase als Referenz erfolgten unter gleichen Bedingungen. Demzufolge entsprechen die ermittelten apparenten k_{cat} -Werte für die Hydrolyse- sowie Aminolysereaktion von Trypsiligase-Variante 2G10 dem halbmaximalen tatsächlichen k_{cat} -Wert und von Trypsiligase einem Zehntel des tatsächlichen k_{cat} -Wertes. Die Konzentration des Nucleophils wurde zwischen $0\text{-}9600 \mu\text{M}$ (bzw. $0\text{-}4800 \mu\text{M}$ bei Trypsiligase) variiert. Die Partitionierung der Deacylierungsreaktion via Aminolyse oder Hydrolyse erlaubt die gleichzeitige Bestimmung der apparenten Wechselzahlen für die Aminolyse- sowie Hydrolysereaktion.

In Abbildung 16 ist die graphische Auftragung der ermittelten Wechselzahlen gegen die Konzentration des peptidischen Nucleophils für Trypsiligase-Variante 2G10 dargestellt. Die korrespondierende Auftragung für Trypsiligase befindet sich im Anhang (vgl. Anhang Abb. A11, S. 182). Bei Trypsiligase-Variante 2G10 konnte für die Deacylierung via Aminolyse eine apparente Wechselzahl von $0,05 \text{ s}^{-1}$ bei einer Nucleophilkonzentration von $400 \mu\text{M}$ gemessen werden. Eine weitere Erhöhung der Nucleophilkonzentration führte konzentrationsabhängig zur Verlangsamung der Aminolysereaktion. Ein ähnliches Verhalten zeigte sich für Trypsiligase. Der Kurvenverlauf ist hierbei typisch für eine Substratüberschuss-Hemmung. Für die Hydrolysereaktion konnte eine maximale Wechselzahl von $0,031 \text{ s}^{-1}$ in Abwesenheit des peptidischen Nucleophils gemessen werden. Bei Zugabe des Nucleophils H-RHAK-OH nahm die Aktivität der Deacylierung via Hydrolyse ab. Die Auftragung der apparenten Wechselzahlen gegen die Nucleophilkonzentration ergibt einen inversen hyperbolen Kurvenverlauf. Durch eine nicht lineare Regression der aufgetragenen Werte für die Aminolyse- sowie Hydrolysereaktion (vgl. 3.6.2, S. 82) konnten die in Tabelle 27 zusammengefassten enzymkinetischen Parameter für die durch Trypsiligase-Variante 2G10 sowie Trypsiligase-katalysierte Transamidierungsreaktion bestimmt werden.

Bei Trypsiligase-Variante 2G10 konnte für das peptidische Nucleophil als Acylakzeptor ein K_m -Wert von $43,1 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Dieser befindet sich in der gleichen Größenordnung,

wie der für das Substrat bestimmte K_m -Wert von $80 \mu\text{M}$. Für Trypsiligase konnte mit $193,7 \mu\text{M}$ ein um Faktor 4,5 gesteigerter K_m -Wert für das Nukleophil bestimmt werden.

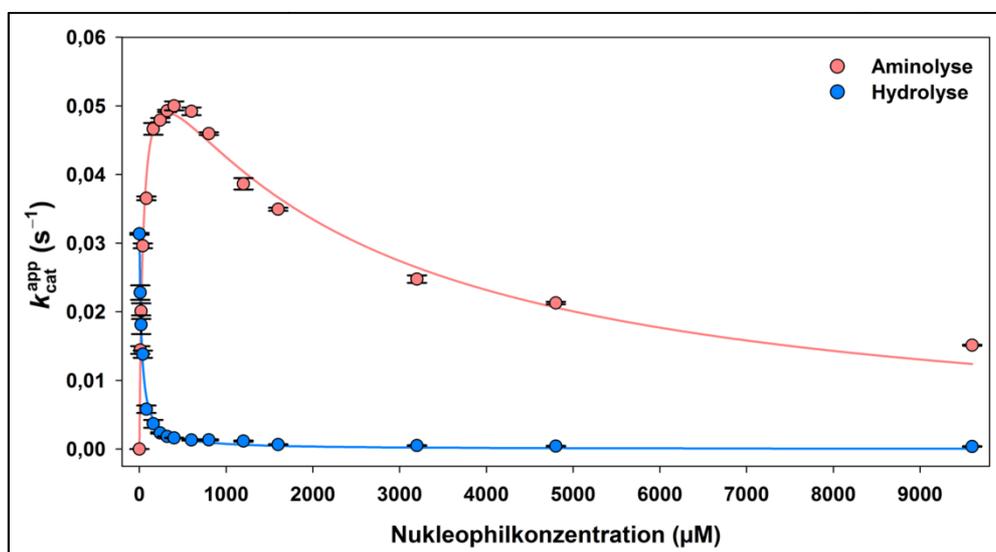


Abbildung 16: Graphische Auswertung zur Abhängigkeit der durch Trypsiligase-Variante 2G10 katalysierten Transamidierungsreaktion von der Konzentration des peptidischen Nucleophils. Die Messung der apparenten Wechselzahlen für die Aminolyse- sowie Hydrolysereaktion erfolgte bei einer variierenden Nucleophilkonzentration von 0-9600 μM . Die erhaltenen Messwerte wurden als Funktion der Nucleophilkonzentration aufgetragen. Die nichtlineare Regressionsanalyse sowie die Ermittlung der enzymkinetischen Parameter erfolgten für die Aminolysereaktion mittels der Gleichungen 5-7 und für die Hydrolysereaktion mittels Gleichung 8. Die enzymkinetischen Parameter werden in Tabelle 27 zusammengefasst. Reaktionsbedingungen: $0,1 \mu\text{M}$ Trypsiligase-Variante 2G10, $80 \mu\text{M}$ Bz-AAAYRHAAG-OH, $0-9600 \mu\text{M}$ H-RHAK-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , $100 \mu\text{M}$ ZnCl_2 , pH 7,8 bei $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. Alle aufgetragenen Wechselzahlen stellen den Mittelwert zweier unabhängig durchgeführten Messreihen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Anstiegs aus der Geradengleichung der linearen Regressionsanalyse.

Tabelle 27: Zusammenfassung der enzymkinetischen Parameter des peptidischen Nucleophils bezogen auf die enzymkatalysierte Transamidierungsreaktion. AL: Aminolysereaktion, HL: Hydrolysereaktion, $k_{\text{cat,AL}}^{\text{app,opt}}$: optimale apparente Wechselzahl der Aminolysereaktion, $[\text{N}_{\text{opt}}]$: optimale Nucleophilkonzentration.

Enzym	Aminolyse					Hydrolyse	
	$k_{\text{cat,AL}}$ (s^{-1})	K_m (μM)	K_i (μM)	$k_{\text{cat,AL}}^{\text{app,opt}}$ (s^{-1})	$[\text{N}_{\text{opt}}]$ (μM)	K_m' (μM)	$k_{\text{cat,HL}}$ (s^{-1})
2G10	0,062 $\pm 0,002$	43,1 $\pm 4,6$	2395,5 $\pm 241,9$	0,049	321,3	25,5 $\pm 2,0$	0,031 $\pm 0,001$
Trypsiligase	0,051 $\pm 0,005$	193,7 $\pm 37,6$	1315,7 $\pm 246,2$	0,029	504,8	137,5 $\pm 17,5$	0,051 $\pm 0,002$

Durch die Nucleophil-bedingte Hemmung der Deacylierung mittels Aminolyse konnte für Trypsiligase-Variante 2G10 unter den gegebenen Reaktionsbedingungen eine optimale apparente Katalysekonstante ($k_{\text{cat}}^{\text{opt}}$) von $0,049 \text{ s}^{-1}$ berechnet werden. Diese wird bei einer optima-

len Nukleophilkonzentration von 320 μM erreicht. Dies korreliert mit dem gemessenen Wert von $0,05 \text{ s}^{-1}$ bei einer Nukleophilkonzentration von 400 μM . Für die ungehemmte Reaktion konnte eine Katalysekonstante von $0,062 \text{ s}^{-1}$ berechnet werden. Dabei ergibt sich für das Nukleophil ein K_i -Wert von 2395,5 μM .

Für die ebenfalls ablaufende Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediates durch Wasser konnte für Trypsiligase-Variante 2G10 bereits bei einer Nukleophilkonzentration von 25,5 μM eine Halbierung der maximalen Katalysegeschwindigkeit verzeichnet werden. Bei Trypsiligase trat eine Halbierung erst bei einer Nukleophilkonzentration von 137,5 μM auf. Resultierend aus dem Ergebnis für Trypsiligase-Variante 2G10 wurden alle weiteren Studien zur Temperatur-, pH-Wert- sowie Zinkionenabhängigkeit bei einer Substratkonzentration von 80 μM sowie 5 Äquivalenten Nukleophil (400 μM) durchgeführt.

4.5.3 Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der Transamidierungsreaktion

Die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Transamidierungsreaktion von Trypsiligase-Variante 2G10 erfolgte wie unter 3.6.2 beschrieben. Hierbei wurden Transamidierungsstudien mit 80 μM Substrat (Bz-AAYRHAAG-OH) sowie 400 μM Nukleophil (H-RHAK-OH) bei variierender Temperatur durchgeführt. Die eingesetzte Substratkonzentration korreliert mit dem ermittelten K_m -Wert für das Substrat, womit die ermittelten apparenten Wechselzahlen (k_{cat}^{app}) für die Aminolyse- sowie Hydrolysereaktion gemäß Gleichung 10 den halbmaximalen Werten entsprechen, welche bei Substratsättigung erreicht werden. Für die graphische Auswertung erfolgte die Auftragung der apparenten Wechselzahlen (k_{cat}^{app}) für Aminolyse- sowie Hydrolysereaktion gegen die Temperatur (Abb. 17A). Zur thermodynamischen Beschreibung des Übergangszustandes bei der Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediates mittels Wasser oder Peptidnukleophil sollten die freie Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger , die Aktivierungsenthalpie ΔH^\ddagger , sowie die Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger des aktivierten Komplexes bestimmt werden. Hierzu wurden zunächst die Katalysekonstanten (k_{cat}), welche bei Substratsättigung erhalten werden, mittels Gleichung 9 berechnet. Anschließend erfolgte eine graphische Auswertung nach EYRING, wobei die logarithmierten Werte der temperaturnormierten theoretischen Wechselzahlen für Aminolyse- sowie Hydrolysereaktion als Funktion der reziproken absoluten Messtemperatur aufgetragen wurden (Abb. 17B).

Innerhalb des Temperaturintervalls von 283,15 K bis 298,15 K ergibt sich bei dieser Auftragung ein linearer Kurvenverlauf. Dies entspricht dem Temperaturbereich, in dem sich für das

Enzym kein temperaturinduzierter Aktivitätsverlust ergibt. Erst oberhalb von 298,15 K weichen die Messdaten vom linearen Verlauf ab, was vermutlich auf eine thermisch induzierte Denaturierung des Enzyms zurückzuführen ist. Die Berechnung der thermodynamischen Parameter erfolgte durch eine Regressionsanalyse des linear verlaufenden Bereichs mittels der linearisierten EYRING-Gleichung (Gl. 11). Aufgrund der geringen Anzahl von Datenpunkten innerhalb des betrachteten Temperaturintervalls dienen die ermittelten Parameter lediglich zur initialen thermodynamischen Beschreibung des Übergangszustandes bei der Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediates via Aminolyse oder Hydrolyse. Der Anstieg der Geraden entspricht $-\Delta H^\ddagger/R$. Da dieser bei der Hydrolyse- sowie Aminolysereaktion nahezu gleich war, wurde der Anstieg der Aminolyse gleich dem berechneten Anstieg der Hydrolyse gesetzt. Die Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse und wurde mittels Gleichung 11 berechnet. Die freie Aktivierungsenthalpie wurde schließlich mittels der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Gl. 12) berechnet. Die thermodynamischen Parameter für die Aminolyse- sowie Hydrolyse-reaktion sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

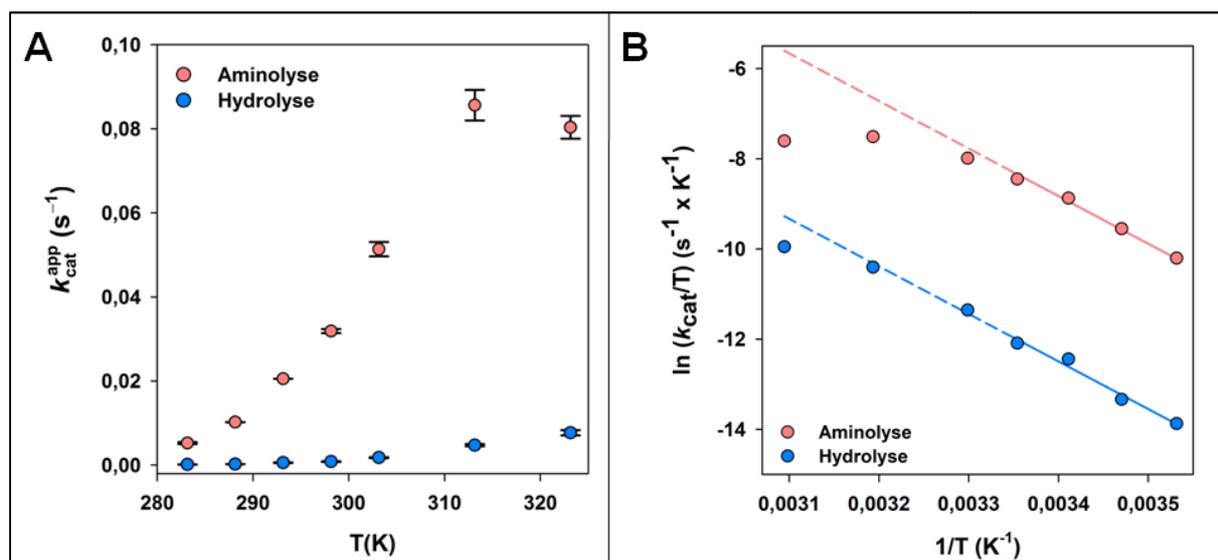


Abbildung 17: Graphische Auswertung zur Temperaturabhängigkeit der Transamidierungsreaktion für Trypsiligase-Variante 2G10. Die Messung der apparenten Wechselzahlen für die Aminolyse- sowie Hydrolyse-reaktion erfolgte bei einer Variation der Messtemperatur zwischen 10 und 50 °C. **A)** Direkte Auftragung der apparenten Wechselzahlen als Funktion der Messtemperatur. **B)** Entsprechend einer Analyse nach EYRING wurden die auf die Messtemperatur normierten apparenten Wechselzahlen logarithmiert und als Funktion der reziproken Messtemperatur aufgetragen. Eine Regressionsanalyse zur Bestimmung der thermodynamischen Parameter erfolgte für den Temperaturbereich 283,15-298,15 K. Diese sind in Tabelle 28 zusammengefasst. Reaktionsbedingungen: 0,05-0,2 μM Trypsiligase-Variante 2G10, 80 μM Bz-AAYRHAAG-OH, 400 μM H-RHAK-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 100 μM $ZnCl_2$, pH 7,8 bei $T = 283,15$ - $323,15$ K. Alle aufgetragenen Wechselzahlen stellen den Mittelwert zweier unabhängig durchgeführter Messreihen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Anstiegs aus der Geradengleichung der linearen Regressionsanalyse.

Es ist ersichtlich, dass für die Ausbildung des aktivierten Komplexes bei der Deacylierung via Aminolyse eine geringere freie Aktivierungsenthalpie benötigt wird, als bei der Deacylierung

mittels Hydrolyse. Ausschlaggebend hierfür sind die unterschiedlichen entropischen Beiträge der beiden Reaktionen. So ergibt sich für Hydrolysereaktion nahezu keine Änderung bei der Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger , währenddessen bei der Aminolysereaktion eine deutliche Entropiezunahme zu verzeichnen ist. Die Differenz der Aktivierungsentropien von Aminolyse zu Hydrolyse ($\Delta\Delta S^\ddagger$) beträgt ca. $30 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$. Hinsichtlich der freien Aktivierungsenthalpie ergibt sich hieraus bei einer Reaktionstemperatur von 298,15 K ein Energiebetrag von ca. $-9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Somit ist die Deacylierung via Aminolysereaktion aufgrund einer geringeren freien Aktivierungsenthalpie gegenüber der Hydrolysereaktion favorisiert.

Tabelle 28: Zusammenfassung der thermodynamischen Parameter für die durch Trypsiligase-Variante 2G10 katalysierte Transamidierungsreaktion im Temperaturbereich von 283,15-298,15 K.

Aminolyse			Hydrolyse		
ΔH^\ddagger ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	ΔS^\ddagger ($\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$)	ΔG^\ddagger bei 298,15 K ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	ΔH^\ddagger ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	ΔS^\ddagger ($\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$)	ΔG^\ddagger bei 298,15 K ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
$87,2 \pm 9,5$	$27,3 \pm 4,6$	79,1	$87,2 \pm 9,5$	$-3,2 \pm 0,5$	88,2

4.5.4 Untersuchungen zur pH- sowie Zinkionenabhängigkeit der Transamidierungsreaktion

Die Untersuchungen der pH- sowie Zinkionenabhängigkeit von Trypsiligase-Variante 2G10 erfolgten wie unter 3.6.2 (S. 82) beschrieben. Hierzu wurde (i) der pH-Wert zwischen 6,6 und 8,4 variiert und (ii) eine Zinkionenkonzentration zwischen 0 und $800 \mu\text{M}$ verwendet. Wie in Abbildung 18 sowie Tabelle 29 ersichtlich ist, konnte für die Aminolysegeschwindigkeit ein Maximalwert von $0,058 \text{ s}^{-1}$ bei einem pH-Wert von 7,4 ermittelt werden. Die korrespondierende Hydrolysegeschwindigkeit liegt bei $0,0017 \text{ s}^{-1}$. Hiervon ausgehend führt eine Verringerung bzw. Erhöhung des pH-Wertes zur Erniedrigung der Aminolysegeschwindigkeit mit Minimalwerten von $0,046 \text{ s}^{-1}$ sowie $0,041 \text{ s}^{-1}$ bei pH-Wert 6,6 respektive 8,4. Die korrespondierenden Hydrolysegeschwindigkeiten liegen bei $0,0025 \text{ s}^{-1}$ und $0,0020 \text{ s}^{-1}$ (Tab. 29). Somit ergibt sich für den vermessenen pH-Wert Bereich ein günstiges Verhältnis von Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit zwischen 18 und 35. Hinsichtlich der katalysierten Transamidierungsreaktion zeigt Trypsiligase-Variante 2G10 somit eine hohe Toleranz bezüglich des verwendeten pH-Wertes im Reaktionsansatz. Weitere Transamidierungsstudien wurden bei einem pH-Wert 7,8 durchgeführt. Dies entspricht den Standardreaktionsbedingungen der nativen Trypsiligase und ermöglicht einen Vergleich der publizierten Daten mit den in dieser Arbeit generierten Daten.

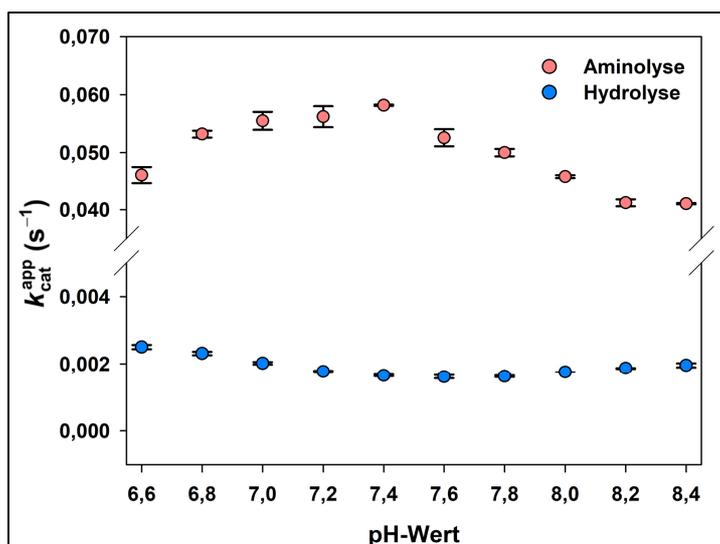


Abbildung 18: Graphische Auswertung zur Abhängigkeit der durch Trypsinligase-Variante 2G10 katalysierten Transamidierungsreaktion vom pH-Wert. Die Messung der apparenten Wechselzahlen für die Aminolyse- sowie Hydrolysereaktion erfolgte in einem pH-Bereich von 6,6 bis 8,4. Die ermittelten Messwerte sind in Tabelle 29 zusammengefasst. Reaktionsbedingungen: 0,1 μ M Trypsinligase-Variante 2G10, 80 μ M Bz-AAYRHAAG-OH, 400 μ M H-RHAK-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μ M ZnCl₂, pH 6,6-8,4 bei T = 30 °C. Alle aufgetragenen Wechselzahlen stellen den Mittelwert zweier unabhängig durchgeführten Messreihen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Anstiegs aus der Geradengleichung der linearen Regressionsanalyse.

Tabelle 29: Zusammenfassung der apparenten Wechselzahlen für die Aminolyse sowie Hydrolyse bei Variation des pH-Wertes für die durch Trypsinligase-Variante 2G10 katalysierte Transamidierungsreaktion. AL: Aminolysereaktion, HL: Hydrolysereaktion.

pH-Wert	$k_{cat,AL}^{app}$ (s ⁻¹)	$k_{cat,HL}^{app}$ (s ⁻¹)	$k_{cat,AL}^{app} : k_{cat,HL}^{app}$
6,6	0,046 ± 0,001	0,0025 ± 0,0001	18
6,8	0,053 ± 0,001	0,0023 ± 0,0001	23
7,0	0,055 ± 0,002	0,0020 ± 0,0001	27
7,2	0,056 ± 0,002	0,0018 ± 0,0001	32
7,4	0,058 ± 0,000	0,0017 ± 0,0001	35
7,6	0,053 ± 0,001	0,0016 ± 0,0001	33
7,8	0,050 ± 0,001	0,0016 ± 0,0001	31
8,0	0,046 ± 0,000	0,0018 ± 0,0001	26
8,2	0,041 ± 0,001	0,0019 ± 0,0001	22
8,4	0,041 ± 0,000	0,0020 ± 0,0001	21

Bezüglich der Zinkionenabhängigkeit für die Trypsinligase-Variante 2G10 zeigt Abbildung 19 die Abhängigkeit der Aminolyse- sowie Hydrolysegeschwindigkeit von der Zinkionen-Konzentration. Die apparenten Wechselzahlen für die Aminolyse- sowie Hydrolysereaktion bei variierender Zinkionen-Konzentration sowie deren Verhältnis sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

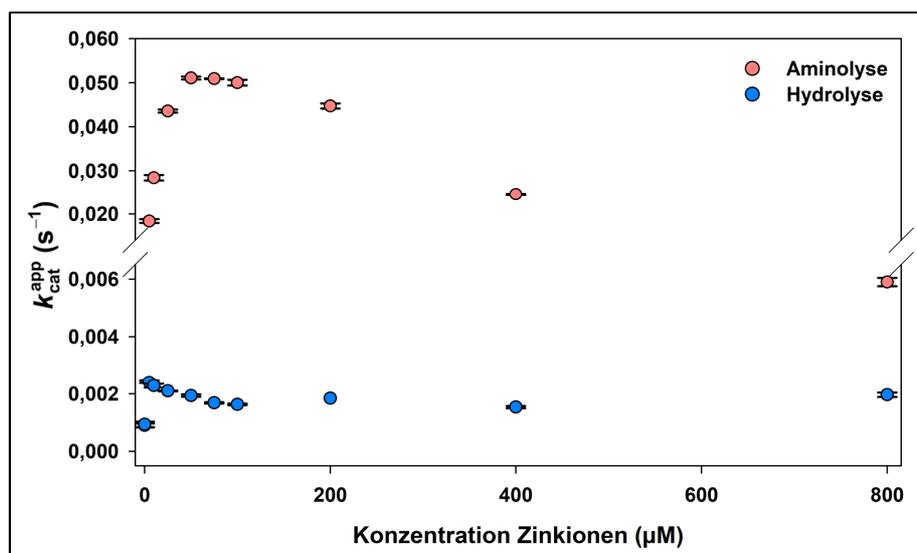


Abbildung 19: Graphische Auswertung zur Abhängigkeit der Transamidierungsreaktion von der Zinkionen-Konzentration für Trypsin-Variante 2G10. Die Messung der apparenten Wechselzahlen für die Aminolyse- sowie Hydrolysereaktion erfolgte bei einer variierenden Zinkionen-Konzentration von 0-800 μM . Die erhaltenen Messwerte wurden als Funktion der Zinkionen-Konzentration aufgetragen und sind in Tabelle 30 zusammengefasst. Reaktionsbedingungen: 0,1 μM Trypsin-Variante 2G10, 80 μM Bz-AAyrHAAG-OH, 400 μM H-RHAK-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0-800 μM ZnCl₂, pH 7,8 bei T = 30 °C. Alle aufgetragenen Wechselzahlen stellen den Mittelwert zweier unabhängig durchgeführter Messreihen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Anstiegs aus der Geradengleichung der linearen Regressionsanalyse.

Tabelle 30: Zusammenfassung der apparenten Wechselzahlen für die Aminolyse sowie Hydrolyse im Deacylierungsschritt der Transamidierungsreaktion bei Variation der Zinkionenkonzentration. AL: Aminolysereaktion, HL: Hydrolysereaktion.

$[\text{Zn}^{2+}]$ (μM)	$k_{cat,AL}^{app}$ (s^{-1})	$k_{cat,HL}^{app}$ (s^{-1})	$k_{cat,AL}^{app} : k_{cat,HL}^{app}$
0	0,001 ± 0,001	0,0009 ± 0,0001	1
5	0,018 ± 0,004	0,0024 ± 0,0000	8
10	0,028 ± 0,006	0,0023 ± 0,0001	12
25	0,044 ± 0,003	0,0021 ± 0,0000	21
50	0,051 ± 0,003	0,0019 ± 0,0000	26
75	0,051 ± 0,001	0,0017 ± 0,0000	30
100	0,050 ± 0,006	0,0016 ± 0,0000	31
200	0,045 ± 0,006	0,0018 ± 0,0000	24
400	0,025 ± 0,002	0,0015 ± 0,0000	16
800	0,006 ± 0,001	0,0020 ± 0,0001	3

Hierbei zeigte sich:

- (i) dass die Aminolysegeschwindigkeit mit steigender Zinkionenkonzentration zunimmt, wobei eine maximale Katalysegeschwindigkeit zwischen 50-100 μM Zinkionen erreicht wird,
- (ii) dass eine Erhöhung der Zinkionen-Konzentration über 100 μM zu einer Verringerung der

Aminolysegeschwindigkeit führt, was eventuell durch eine Metallionen-induzierte Denaturierung des Biokatalysators bedingt ist,

(iii) dass die Aminolysereaktion in Anwesenheit von 50-100 μM Zinkionen um den Faktor 50 schneller ist, als ohne Zinkionen,

(iv) dass das beste Verhältnis von Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit (Faktor 31) bei einer Zinkionen-Konzentration von 100 μM erreicht wird. Somit wurde bei allen weiterführende Transamidierungsstudien eine Zinkionen-Konzentration von 100 μM eingesetzt.

4.5.5 Untersuchungen zur Syntheseeffizienz der Trypsiligase-Variante 2G10 am Modellsystem

Um die Syntheseeffizienz unterschiedlicher Biokatalysatoren miteinander vergleichen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein graphisches Auswerteverfahren entwickelt, welches (i) die Abhängigkeit der Ausbeute an Transamidierungsprodukt von der eingesetzten Substratkonzentration zeigt und (ii) die Abhängigkeit der Ausbeute an Transamidierungsprodukt vom molaren Überschuss an extern hinzugefügtem Peptidnukleophil darlegt, wobei sich für die Produktausbeute eine Proportionalität zum Verhältnis von Abgangsgruppe zu Peptidnukleophil ergibt.

Hierzu wurden für Trypsiligase-Variante 2G10 sowie für die native Trypsiligase die Ausbeuten an Transamidierungsprodukt bei einer hohen sowie niedrigen Substratkonzentration (250 μM respektive 15 μM) in Anwesenheit von 2, 5, 10 sowie 20 molaren Äquivalenten des peptidischen Nukleophils gemessen. Für die graphische Darstellung erfolgte eine Auftragung der Produktausbeute gegen die Anzahl an Äquivalenten des Peptidnukleophils bei hoher sowie niedriger Substratkonzentration. Die Fläche zwischen den sich hieraus ergebenden Kurven der hohen und niedrigen Substratkonzentration wird im Folgenden als Syntheseprofil bezeichnet. In Abbildung 20 sind die Syntheseprofile der nativen Trypsiligase sowie der Trypsiligase-Variante 2G10 gezeigt. Zudem ist ein theoretischer Kurvenverlauf gezeigt, welcher sich ergeben würde, wenn die enzymkatalysierte Deacylierungsreaktion ausschließlich über eine Aminolyse des Acyl-Enzym-Intermediates verlaufen würde.

Ein Vergleich der Syntheseprofile von Trypsiligase-Variante 2G10 sowie Trypsiligase zeigt (i) eine deutliche Verschiebung des Syntheseprofiles von Trypsiligase-Variante 2G10 hin zum thermodynamisch idealen Kurvenverlauf und (ii) für Trypsiligase-Variante 2G10 eine Verringerung der Differenz bei den erzielten Produktausbeuten mit hoher sowie niedriger Substrat-

konzentration bei gleicher Äquivalentanzahl an Peptidnukleophil, was wiederum mit einer deutlich gesteigerten Syntheseeffizienz bei niedrigen Substratkonzentrationen korreliert. Somit konnte für Trypsiligase-Variante 2G10 bei allen Substrat-Nukleophil-Kombinationen eine deutliche Steigerung der Syntheseeffizienz im Vergleich zur nativen Trypsiligase verzeichnet werden, deren Ausprägung mit abnehmender Substratkonzentration deutlich größer wird. Beispielhaft hierfür sollen die Ausbeuten bei hoher und niedriger Substratkonzentration mit einem zweifachen Überschuss an Nukleophil betrachtet werden. Trypsiligase erreicht bei den genannten Bedingungen Ausbeuten von 42,2 % bei 250 μM Substrat sowie 10,9 % bei 15 μM Substrat. Bei hoher Substratkonzentration erreicht Trypsiligase-Variante 2G10 eine Ausbeute von 59,3 %, was eine Steigerung um den Faktor 1,4 bedeutet. Bei 15 μM Substrat erzielt Trypsiligase-Variante 2G10 mit 39,6 % eine um den Faktor 3,6 gesteigerte Ausbeute gegenüber Trypsiligase.

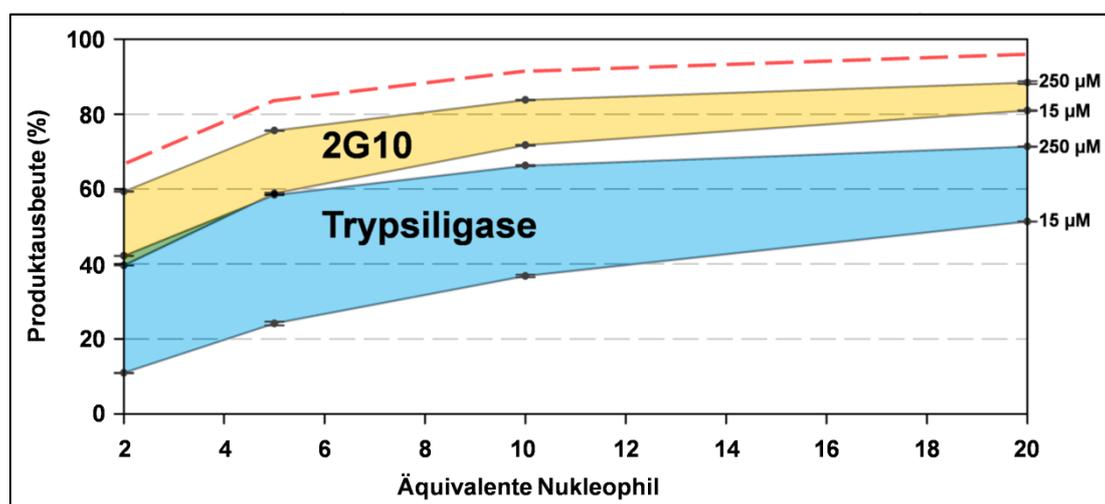


Abbildung 20: Vergleichende Darstellung der Synthesepprofile von Trypsiligase-Variante 2G10 sowie Trypsiligase. Die Messung der Produktausbeuten für die Erstellung der Synthesepprofile erfolgte bei 15 μM und 250 μM Substrat in Kombination mit 2, 5, 10 sowie 20 molaren Äquivalenten Peptidnukleophil. Die erreichten Produktausbeuten wurden als Funktion der Äquivalentanzahl an Nukleophil aufgetragen. Die rot gestrichelte Linie zeigt einen theoretischen Kurvenverlauf mit den thermodynamisch maximal erreichbaren Produktausbeuten. Reaktionsbedingungen: 0,5-10 μM Enzymvariante, 15/250 μM Bz-AAYRHAAG-OH, 2/5/10/20 mol. Äquivalente H-RHAK-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 100 μM ZnCl_2 , pH 7,8 bei $T = 30^\circ\text{C}$. Alle aufgetragenen Meßwerte stellen den Mittelwert zweier unabhängig durchgeführten Messungen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittlere absolute Abweichung.

4.6 Proteinmodifizierung mit Trypsiligase-Variante 2G10

Als ein praxisorientiertes Anwendungsbeispiel für die Modifizierung von Proteinen mit dem Fokus der Generierung von Antikörper-Toxin-Konjugaten sollten zwei Fab-Fragmente mit unterschiedlichen Funktionalitäten modifiziert werden. In Anlehnung an das therapeutisch zugelassene Antikörper-Toxin-Konjugat (ADC) Kadcyra[®] (Trastuzumab emtansin) sollte ein

Her2/neu-spezifisches Fab-Fragment mit dem Toxin DM1 modifiziert werden. Desweiteren sollte ein TNF α -spezifisches Fab-Fragment mit 20 kDa schwerem Polyethylenglycol, welches im Folgenden als PEG20k bezeichnet wird, funktionalisiert werden. Diese Modifikation ähnelt dem therapeutisch zugelassenen Antikörper-Fragment-Konjugat Cimzia[®] (Certolizumab pegol). Um die Modifizierungseffizienz der beiden Fab-Fragmente exakt miteinander vergleichen zu können, erfolgte zudem eine Kopplung mit einem Referenznukleophil, welches mit Carboxyfluorescein ausgestattet wurde.

4.6.1 Präparative Herstellung von Fab-Fragmenten

Die präparative Herstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Fab-Fragmente erfolgte wie unter 3.2.1.3 (S. 55) beschrieben. Unter Verwendung des *E. coli*-Stammes BL21 (DE3) wurde die periplasmatische Herstellung im 1-4 Liter-Maßstab durchgeführt. Nach Zellaufschluss erfolgte eine Reinigung des im Zellextrakt befindlichen Fab-Fragmentes durch ein chromatographisches Zweischrittreinigungsverfahren (vgl. 3.3.2, S. 60). Dieses bestand aus einer Protein G-basierten Affinitätschromatographie sowie einer nachfolgenden Größenausschlusschromatographie. Beispielhaft hierfür ist der in Abbildung 21 gezeigte Reinigungsverlauf eines Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmentes, bei welchem der C-Terminus der schweren Kette um die Aminosäuresequenz H-TAAYRHAAGEQKLISEEDL-OH (unterstrichene Sequenz entspricht dem cMyc-tag, entsprechendes Fab wird im Weiteren als Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc bezeichnet) verlängert wurde. Zunächst wurde das im Zellextrakt befindliche Fab-Fragment durch eine Protein G-basierte Affinitätschromatographie isoliert und konzentriert (Abb. 21A). In der sich anschließenden Größenausschlusschromatographie konnte ausschließlich ein einzelner Peak bei einem Elutionsvolumen von ca. 55-65 ml verzeichnet werden (Abb. 21B).

Zur Beurteilung der Reinheit des Fab-Fragmentes erfolgte für die Elutionsfraktionen eine Analyse mittels nicht reduzierender SDS-PAGE (Abb. 21D). So konnte in den aufgetragenen Fraktionen der Protein G-basierten Affinitätschromatographie eine distinkte Proteinbande bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 50 kDa detektiert werden, welche dem Fab-Fragment mit disulfidverbrückter schwerer und leichter Kette zugeordnet werden konnte. Mit einem deutlich geringeren Anteil konnten Banden bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 25 kDa verzeichnet werden, bei welchen es sich vermutlich um unverbrückte schwere oder leichte Ketten handelte. In den Bahnen, in denen Elutionsfraktionen der nachfolgenden Größenausschlusschromatographie aufgetragen wurden, konnte bei Fraktion 12 eine distinkte

Proteinbande (Spezies 1) bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 50 kDa detektiert werden. In den Fraktionen 13 bis 15 ist kurz unterhalb dieser Proteinbande eine weitere Bande sichtbar, deren quantitativer Anteil von Fraktion 13 hin zu Fraktion 15 ansteigt. Eine massenspektrometrische Analyse der einzelnen Fraktionen (Abb. 21C) ergab, dass die Fraktionen 13-15 neben dem gewünschten Fab-Fragment Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc auch proteolytische Abbauprodukte (Spezies 2-4) enthielten. Hierbei handelt es sich um Fab-Fragmente mit einer proteolytischen Spaltung innerhalb der artifiziell eingeführten Aminosäuresequenz H-TAAYRHAAGEQKLISEEDL-OH.

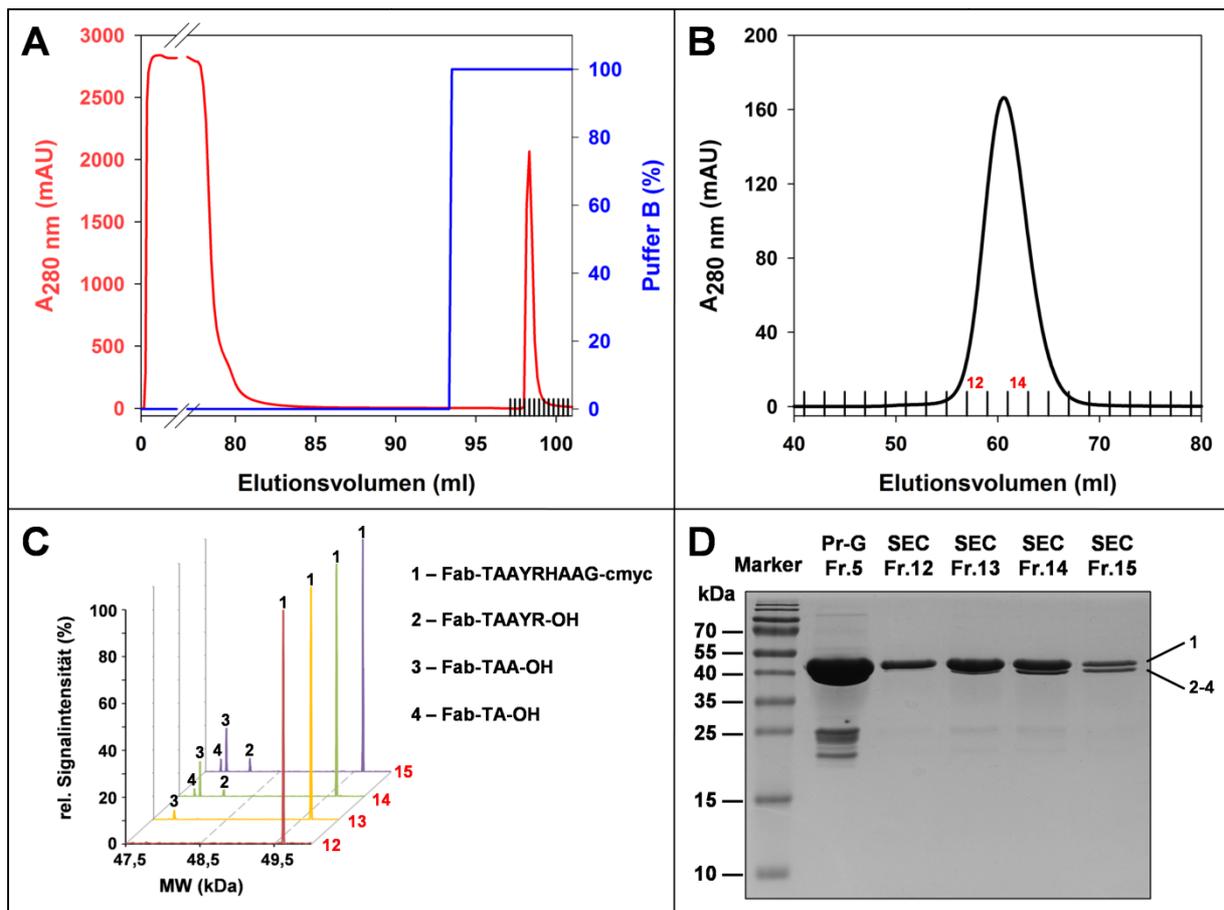


Abbildung 21: Übersicht zum Reinigungsverlauf für das Her2/neu-spezifische Fab-Fragment Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc. **A)** Isolierung und Konzentration des Fab-Fragmentes im ersten Reinigungsschritt mittels Protein G-basierter Affinitätschromatographie. **B)** Zweiter Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie mit Fraktionierung des Elutionspeaks (Fraktion 12-15, rot). **C)** Chromatogramm der LC-MS-Analyse für die Fraktionen 12-15 aus der Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie. Peak 1: Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc ($M_{\text{ber.}}$: 49580,4 Da; $M_{\text{gef.}}$: 49581 ± 1 Da), Peak 2: Anti-Her2-Fab-TAAYR-OH ($M_{\text{ber.}}$: 48058,7 Da; $M_{\text{gef.}}$: 48057 ± 1 Da); Peak 3: Anti-Her2-Fab-TAA-OH ($M_{\text{ber.}}$: 47739,4 Da; $M_{\text{gef.}}$: 47739 ± 1 Da); Peak 4: Anti-Her2-Fab-TA-OH ($M_{\text{ber.}}$: 47668,3 Da; $M_{\text{gef.}}$: 47666 ± 1 Da). **D)** Gel der SDS-PAGE-Analyse der Zweischnittpurifizierung des Fab-Fragmentes. Detektion mittels Coomassie-Färbung. Pr-G: Protein G-basierte Affinitätschromatographie; SEC: Größenausschlusschromatographie.

So konnten als Spaltprodukte Anti-Her2-Fab-TA-OH, Anti-Her2-Fab-TAA-OH sowie Anti-Her2-Fab-TAAYR-OH identifiziert werden. Die Fraktionen 13-15 wurden daraufhin verwor-

fen. Fraktion 12, in welcher nur das gewünschte Zielprotein Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc detektiert werden konnte, wurde für eine weitere Verwendung konzentriert und bei -80 °C gelagert.

Ein vergleichbarer Reinigungsverlauf konnte für ein TNF α -spezifisches Fab-Fragment erhalten werden, welches in analoger Weise C-terminal mit der Aminosäuresequenz H-TAAYRHAAGEEQKLISEEDL-OH ausgestattet wurde. Genau wie beim Her2/neu-spezifischen Fab-Fragment ergaben sich für das Anti-TNF α -TAAYRH-cMyc proteolytischen Spaltung innerhalb der artifiziell eingeführten Aminosäuresequenz. Interessanterweise zeigten Fab-Fragmente mit der C-terminalen Aminosäuresequenz H-THYRHAAGEEQKLISEEDL-OH keinerlei unerwünschte Spaltprodukte.

Für Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc ergab sich bei der Herstellung eine Ausbeute von ca. 1,4 mg je Liter Kulturmedium. Die finale Ausbeute reduzierte sich jedoch durch das Verwerfen der Fraktionen 13-15 auf ca. 0,3 mg je Liter Kulturmedium. Für das Fab-Fragment Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc ergab sich mit 0,5 mg je Liter Kulturmedium eine insgesamt geringere Ausbeute. Jedoch war der Anteil an degradiertem Fab-Fragment geringer, wodurch sich eine finale Ausbeute von 0,2 mg je Liter Kulturmedium ergab.

4.6.2 Studien zur Modifizierung von Fab-Fragmenten mittels Trypsiligase-Variante 2G10

Um die Eignung der Trypsiligase-Variante 2G10 zur Modifizierung von Proteinen zu bestätigen, sollten zwei verschiedene Fab-Fragmente mit diversen Peptidnukleophilen, welche sich hinsichtlich ihrer vermittelten Funktionalität unterschieden, derivatisiert werden. Die entsprechenden Untersuchungen zur Syntheseeffizienz erfolgten wie unter 3.6.3 (S. 86) beschrieben.

Initiale Modifizierung mit Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc

Wie in Abbildung 22A gezeigt, wurde zunächst eine initiale Modifizierungsstudie mit einem Her2/neu-spezifischen Fab-Fragment durchgeführt, welches am C-Terminus der schweren Kette (endet mit der Sequenz DKTH, welche der *hinge*-Region im Vollängenantikörper entspricht) mit der Erkennungssequenz YRH sowie einem cMyc-tag ausgestattet war. Dieses wird im Folgenden als Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc bezeichnet und wurde freundlicher Weise von K. GÖLDNER (AG BORDUSA, MLU Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

Für die Modifizierung wurde das Referenznukleophil RHAK(CF)-OH im zehnfachen Überschuss eingesetzt, wobei die Konzentration des Fab-Fragmentes 100 μM betrug. Bei den Untersuchungen zur Syntheseeffizienz mit dem Modellpeptid Bz-AA YRHAAG-OH konnte unter gleichen Bedingungen eine Produktausbeute von ca. 82 % nach ca. 20 min erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Mit dem Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc wurde lediglich eine maximale Produktausbeute von ca. 55 % nach einer Reaktionszeit von 150 min erzielt (Abb. 22B).

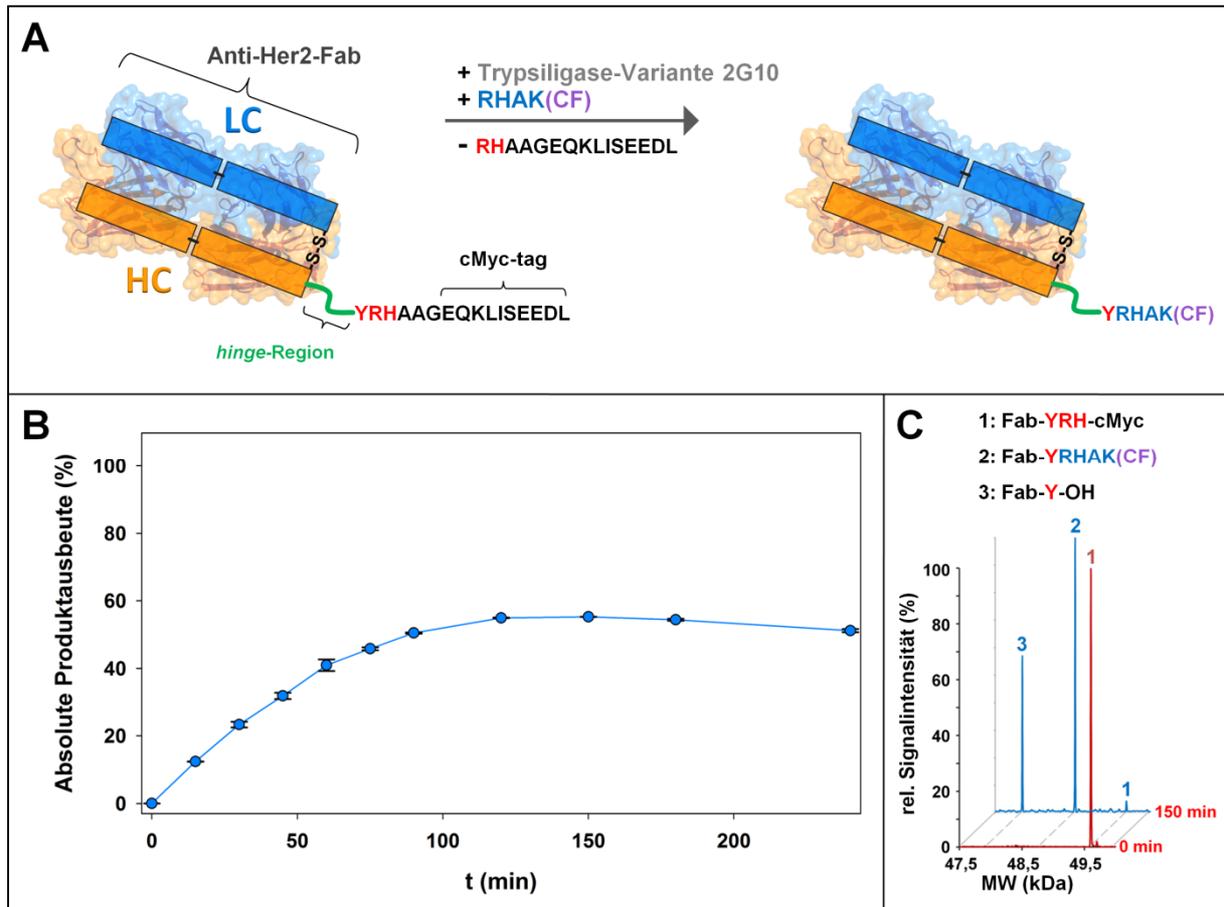


Abbildung 22: Trypsiligase-Variante 2G10-katalysierte Modifizierung des Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmentes Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc mit Carboxyfluorescein. A) Schematische Darstellung der C-terminalen Modifizierung von Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc mit Carboxyfluorescein katalysiert durch Trypsiligase-Variante 2G10. LC: Leichte Kette; HC: Schwere Kette B) Progresskurve der Modifizierung von Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc mit Carboxyfluorescein. Die Ausbeuten an Aminolyseprodukt wurden als Funktion der Reaktionszeit aufgetragen. Reaktionsbedingungen: 10 μM Trypsiligase-Variante 2G10, 100 μM Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc, 1000 μM H-RHAK(CF)-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 100 μM ZnCl_2 , pH 7,8 bei $T = 30^\circ\text{C}$. Alle aufgetragenen Messwerte stellen den Mittelwert zweier unabhängig durchgeführter Messungen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittlere absolute Abweichung. In Tabelle 31 sind die wichtigsten Parameter der Modifizierungsreaktion zusammengefasst. C) Chromatogramm der LC-MS Analyse für den Reaktionsansatz bei einer Reaktionszeit von 0 und 150 min. Peak 1: Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc ($M_{\text{ber.}}$: 49575,3 Da; $M_{\text{gef.}}$: 49575 ± 1 Da), Peak 2: Anti-Her2-Fab-THYRHAK(CF)-OH ($M_{\text{ber.}}$: 48748,4 Da; $M_{\text{gef.}}$: 48749 ± 1 Da); Peak 3: Anti-Her2-Fab-THY-OH ($M_{\text{ber.}}$: 47897,4 Da; $M_{\text{gef.}}$: 47898 ± 1 Da).

Die Ausbeute an Hydrolyseprodukt betrug zum Zeitpunkt des Maximums an Aminolyseprodukt ca. 31 %. Der hohe Anteil des Hydrolyseproduktes konnte ebenfalls massenspektrometrisch bestätigt werden (Abb. 22C). Der Grund für die verminderte Ausbeute

an Aminolyseprodukt liegt in einem verminderten Quotient aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit, welcher 3,3 betrug (Tab. 31). Für das Modellpeptid ergab sich hierbei ein Quotient von ca. 40. Auch die Reaktionsgeschwindigkeit war mit $0,0013 \text{ s}^{-1}$ um den Faktor 30 vermindert. Als mögliche Ursache wurden hierbei die unterschiedlichen Aminosäuren in Position P2 und P3 betrachtet, welche im Fab-Fragment Threonin und Histidin sind und im Modellpeptid jeweils Alanin.

Tabelle 31: Übersicht zur initialen Modifizierungsstudie für das Fab-Fragment Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc katalysiert durch die Trypsiligase-Variante 2G10. AP: maximale Ausbeute Aminolyseprodukt, HP: Ausbeute Hydrolyseprodukt bei maximalem AP, AL: Aminolysereaktion, HL: Hydrolysereaktion.

AP (%)	HP (%)	$k_{\text{cat,AL}}^{\text{app}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat,HL}}^{\text{app}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat,AL}}^{\text{app}} : k_{\text{cat,HL}}^{\text{app}}$
$55,2 \pm 0,1$	$30,9 \pm 0,1$	$0,0013 \pm 0,0000$	$0,0004 \pm 0,0000$	3,3

Optimierung der hinge-Region für die Modifizierung ausgewählter Fab-Fragmente

Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten Transamidierungsreaktionen mit Modellpeptiden durchgeführt werden, welche (i) die hinge-Region mit der Sequenz DKTH im P-Bereich abbilden und (ii) entsprechende Substitutionen von Aminosäuren der ursprünglichen hinge-Region gegen Alanin aufweisen. In Tabelle 32 sind die gemessenen Peptide sowie die dazugehörigen enzymkinetischen Parameter der Transamidierungsreaktion zusammengefasst, welche mit einem fünffachen Nukleophilüberschuss sowie $100 \mu\text{M}$ Peptidsubstrat erzielt wurden.

Tabelle 32: Übersicht zu Transamidierungsstudien von Trypsiligase-Variante 2G10 mit ausgewählten Peptidsubstraten. Reaktionsbedingungen: $2,5\text{-}5 \mu\text{M}$ Trypsiligase-Variante 2G10, $100 \mu\text{M}$ Peptidsubstrat, $500 \mu\text{M}$ H-RHAK-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , $100 \mu\text{M}$ ZnCl_2 , pH 7,8 bei $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. AP: Maximale Ausbeute Aminolyseprodukt, HP: Ausbeute Hydrolyseprodukt bei maximalem AP, R1: -AAG-OH, AL: Aminolysereaktion, HL: Hydrolysereaktion.

Peptidsubstrat	AP (%)	$k_{\text{cat,AL}}^{\text{app}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat,HL}}^{\text{app}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat,AL}}^{\text{app}} : k_{\text{cat,HL}}^{\text{app}}$
Bz- TH YRH-R ₁	$54,3 \pm 0,3$	$0,0033 \pm 0,0001$	$0,0007 \pm 0,0001$	4,7
Bz- THA YRH-R ₁	$63,0 \pm 0,2$	$0,0349 \pm 0,0006$	$0,0019 \pm 0,0000$	18,4
Bz- TA YRH-R ₁	$69,1 \pm 0,1$	$0,1462 \pm 0,0008$	$0,0056 \pm 0,0001$	26,1
Bz- AA YRH-R ₁	$74,0 \pm 0,5$	$0,0617 \pm 0,0039$	$0,0019 \pm 0,0000$	32,5

Hierbei bestätigte sich die Vermutung, dass die Aminosäuren in Position P2 sowie P3 eine wichtige Rolle spielen. So konnte mit dem Modellpeptid Bz-AA₁YRHAAG-OH, welches als N-terminal biotinyliertes Derivat sowohl in der Selektion als auch im Screening eingesetzt wurde, eine Ausbeute an Aminolyseprodukt von 74 % bei einem Quotienten aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit von 32,5 erhalten werden. Mit dem Peptidsubstrat Bz-

THYRHAAG-OH, welches identisch mit dem P3-P5'-Bereich im Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc ist, betrug die Ausbeute lediglich 55,2 % bei einem Quotienten aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit von 4,7. Zudem war die Aminolysegeschwindigkeit im Vergleich mit dem Peptid Bz-AAYRHAAG-OH um den Faktor 20 vermindert. Die Insertion eines Alanins zwischen Histidin und Tyrosin beim Peptidsubstrat Bz-THYRHAAG-OH (entspricht dem Peptid Bz-THAYRHAAG-OH) führte (i) zur Steigerung der Aminolysegeschwindigkeit um den Faktor 10, (ii) zur Steigerung der Ausbeute auf 63 % und (iii) zu einem verbesserten Quotienten aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit von 18,4. Interessanterweise führte eine Substitution des Histidins durch Alanin beim Peptidsubstrat Bz-THYRHAAG-OH (entspricht dem Peptid Bz-TAYRHAAG-OH) nochmals zu einer deutlichen Verbesserung der Transamidierungsreaktion. Die Aminolysegeschwindigkeit stieg um den Faktor 40 und die Ausbeute lag bei 69,1 %. Der Quotient aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit betrug hierbei 26,1. Somit konnte mit dem Peptid Bz-AAYRHAAG-OH die höchste Ausbeute an Aminolyseprodukt bei moderater Geschwindigkeit erzielt werden. Dementsprechend wurde die *hinge*-Region des Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc in P2- sowie P3-Position angepasst, so dass hieraus das Fab-Fragment Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc resultierte.

Modifizierung von Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc

In Abbildung 23A ist der zeitliche Verlauf der enzymkatalysierten Modifizierung von Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc mit dem Carboxyfluorescein-beladenen Nukleophil H-RHAK(CF)-OH gezeigt. Im Vergleich zur Modifizierung von Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc konnte eine deutliche Steigerung hinsichtlich Produktausbeute und Reaktionsgeschwindigkeit erzielt werden. So konnte bei einem zehnfachen Überschuss des peptidischen Nukleophils die Ausbeute an Aminolyseprodukt von 55,0 auf 76,5 % gesteigert werden (Tab. 33). Maßgeblich hierfür ist die Verbesserung des Quotienten aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit von ursprünglich 3,3 auf 26,4. Zudem wurde die Aminolysegeschwindigkeit um den Faktor 7 gesteigert, so dass die maximale Produktausbeute bereits nach 45 min erreicht wurde.

Desweiteren wurden Modifizierungsreaktionen bei zwei- und fünffachem Überschuss von H-RHAK(CF)-OH durchgeführt. Hierbei konnten Ausbeuten von 46,6 sowie 68,9 % erreicht werden. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit lag mit $0,0183 \text{ s}^{-1}$ beim zweifachen Nukleophilüberschuss vor. Mit zunehmender Nukleophilkonzentration nahm die Reaktionsgeschwindigkeit ab. Diese Substratüberschusshemmung seitens des Nukleophils korreliert mit den Ergebnissen zur Abhängigkeit der Transamidierungsreaktion von der Nukleophilkonzent-

ration, welche für das Modellpeptid Bz-AA_YRHAAG-OH gezeigt wurde (vgl. 4.5.2, S. 104). Die Modifizierungsreaktionen mit zwei-, fünf- und zehnfachem Überschuss an Nukleophil wurden massenspektrometrisch beim Zeitpunkt der maximalen Produktausbeute sowie beim letzten gemessenen Zeitpunkt von 90 min untersucht. Die dekonvolvierten Massenspektren sind in Abbildung 23B gezeigt. Hierbei konnten die korrekten Molekulargewichte für das Edukt sowie das Aminolyse- und Hydrolyseprodukt bestätigt werden. Zudem wurden die Modifizierungsreaktionen zeitaufgelöst mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 24).

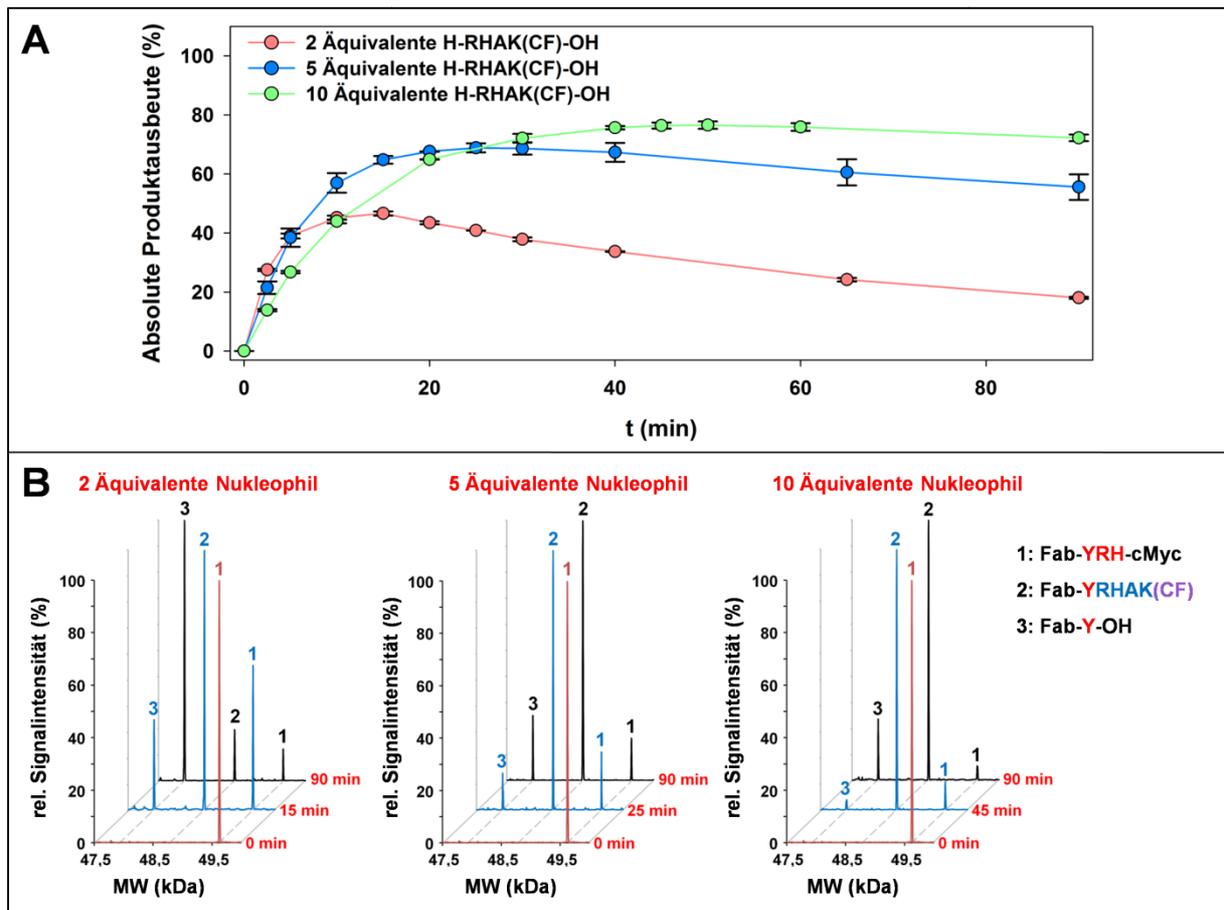


Abbildung 23: Trypsiligase-Variante 2G10-katalysierte Modifizierung des Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmentes Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc mit Carboxyfluorescein. A) Progresskurven der Modifizierung von Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc mit zwei, fünf und zehn Äquivalenten des peptidischen Nucleophils H-RHAK(CF)-OH. Die Ausbeuten an Aminolyseprodukt wurden als Funktion der Reaktionszeit aufgetragen. Reaktionsbedingungen: 10 μ M Trypsiligase-Variante 2G10, 100 μ M Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc, 200/500/1000 μ M H-RHAK(CF)-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μ M ZnCl₂, pH 7,8 bei T = 30 °C. Alle aufgetragenen Messwerte stellen den Mittelwert zweier unabhängig durchgeführter Messungen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittlere absolute Abweichung. In Tabelle 33 sind die wichtigsten Parameter der Modifizierungsreaktion zusammengefasst. **B)** Chromatogramme der LC-MS Analyse für die Reaktionsansätze mit 2/5/10 Äquivalenten Nucleophil bei einer Reaktionszeit von 0 min, dem Zeitpunkt der Maximalausbeute (15/25/45 min) und 90 min. Peak 1: Anti-Her-Fab-TAAYRH-cMyc ($M_{\text{ber.}}$: 49580,4 Da; $M_{\text{gef.}}$: 49581 \pm 1 Da), Peak 2: Anti-Her-Fab-TAAYRHAK(CF) ($M_{\text{ber.}}$: 48753,4 Da; $M_{\text{gef.}}$: 48752 \pm 1 Da), Peak 3: Anti-Her-Fab-TAAY-OH ($M_{\text{ber.}}$: 47902,5 Da; $M_{\text{gef.}}$: 47901 \pm 1 Da).

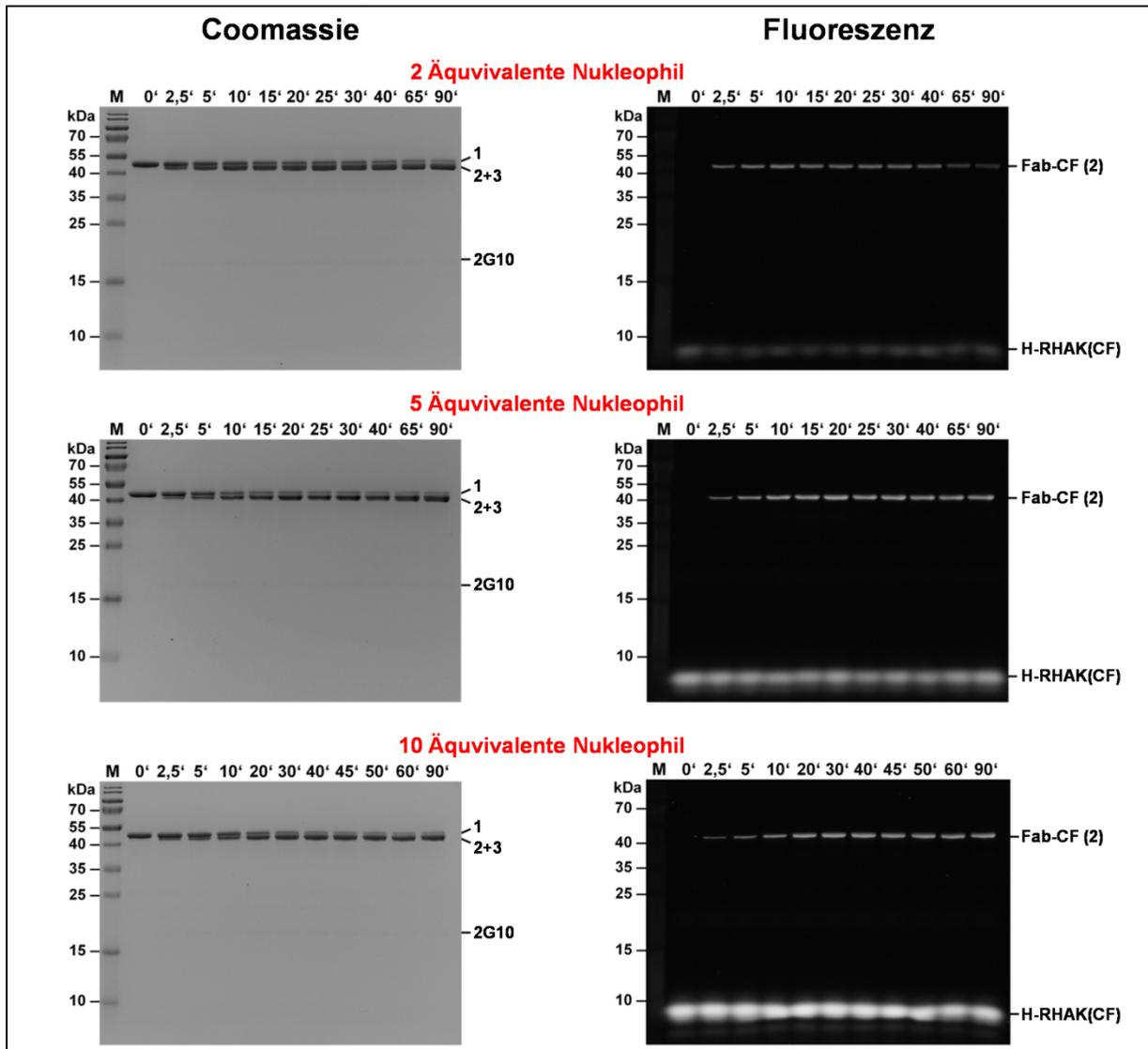


Abbildung 24: SDS-PAGE-Analyse der durch Trypsiligase-Variante 2G10 katalysierten Modifizierung des Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmentes Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc mit Carboxyfluorescein. Gele der SDS-PAGE-Analyse der Modifizierung von Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc mit zwei, fünf und zehn Äquivalenten Nucleophil bei einer Reaktionszeit von 0, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60 sowie 90 min. Die Visualisierung einzelner Peptid- und Proteinspezies erfolgte durch Färbung mittels Coomassie (links) sowie durch Anregung der Fluoreszenz des Carboxyfluoresceins (rechts). Reaktionsbedingungen: 10 μ M Trypsiligase-Variante 2G10, 100 μ M Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc, 200/500/1000 μ M H-RHAK(CF)-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 100 μ M ZnCl_2 , pH 7,8 bei $T = 30^\circ\text{C}$. M: Marker PageRuler prestained protein ladder. Bande 1: Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc; Bande 2: Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(CF); Bande 3: Anti-TNF α -Fab-TAAY-OH; Bande 4: Trypsiligase-Variante 2G10.

Die Detektion erfolgte zum einen durch die Carboxyfluorescein-vermittelte Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und zum anderen durch eine Coomassie-Färbung. Bei der Detektion der Fluoreszenz ließ sich bei einer Reaktionszeit von 0 min lediglich eine diffuse Bande bei einem apparenten Molekulargewicht kleiner 10 kDa verzeichnen, welche dem Nucleophil H-RHAK(CF)-OH zuzuordnen war. Bereits nach einer Reaktionszeit von 2,5 min erschien eine distinkte Fluoreszenzbande bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 45 kDa. Diese entsprach dem Transamidierungsprodukt Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(CF). Mit fortschreitender Reaktionszeit nahm die Intensität der Bande zu,

durchlief ein Maximum und fiel dann wieder ab. Besonders deutlich war dies bei der Analyse der Modifizierungsreaktion mit zweifachem Nukleophilüberschuss zu sehen. Hierbei korrelierte die Zu- und Abnahme der Bandenintensität in Abhängigkeit von der Reaktionszeit sehr gut mit der in Abbildung 23 gezeigten Progresskurve. Auch nach einer Reaktionszeit von 90 min konnten keine weiteren Fluoreszenzbanden bei geringerem Molekulargewicht beobachtet werden, welche ein Hinweis auf eine unspezifische Degradierung des modifizierten Fab-Fragmentes gewesen wäre. Gleiches zeigte sich bei Färbung mittels Coomassie. Hier waren lediglich Banden auszumachen, welche den unmodifizierten, modifizierten sowie hydrolysierten Fab-Fragmentspezies und dem Biokatalysator zugeordnet werden können. Auch bei der massenspektrometrischen Analyse konnten keine unerwünschten Nebenprodukte detektiert werden.

Tabelle 33: Übersicht zur Modifizierung des Fab-Fragmentes Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc mit H-RHAK(CF)-OH und H-RHAK(MCC-DM1)-OH, katalysiert durch die Trypsiligase-Variante 2G10. AP: maximale Ausbeute Aminolyseprodukt, HP: Ausbeute Hydrolyseprodukt bei maximalem AP, AL: Aminolysereaktion, HL: Hydrolysereaktion.

Molare Äquivalente Nukleophil	AP (%)	HP (%)	$k_{\text{cat,AL}}^{\text{app}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{cat,HL}}^{\text{app}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{cat,AL}}^{\text{app}} : k_{\text{cat,HL}}^{\text{app}}$
Modifizierung mit H-RHAK(CF)-OH					
2	46,6 ± 0,7	20,3 ± 0,2	0,0183 ± 0,0000	0,0022 ± 0,0001	8,5
5	68,9 ± 1,5	11,9 ± 2,4	0,0128 ± 0,0009	0,0008 ± 0,0000	16,2
10	76,5 ± 1,2	11,1 ± 0,7	0,0089 ± 0,0002	0,0003 ± 0,0000	26,4
Modifizierung mit H-RHAK(MCC-DM1)-OH					
5	69,6 ± 0,8	11,2 ± 0,2	0,0113 ± 0,0005	0,0007 ± 0,0000	17,0

Alle weiteren Transamidierungsstudien wurden mit fünf Äquivalenten peptidischem Nukleophil durchgeführt, da dies aus Sicht einer praktischen Anwendung als bester Kompromiss zwischen Reaktionsgeschwindigkeit, Produktausbeute und Nukleophilbedarf betrachtet wurde.

Es folgte eine Modifizierung von Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc mit dem Toxin-beladenen Nukleophil H-RHAK(MCC-DM1)-OH (Abb. 25A). Wie in Tabelle 33 ersichtlich ist, konnten mit einer Produktausbeute von 69,6 % sowie einem Aminolyse- zu Hydrolyseverhältnis von 17,0 ähnliche Ergebnisse erhalten werden, wie für die Modifikation mit dem Carboxyfluorescein-beladenen Nukleophil bei gleichen Reaktionsbedingungen. Das korrekte Transamidierungsprodukt konnte massenspektrometrisch bestätigt werden (Abb. 25B).

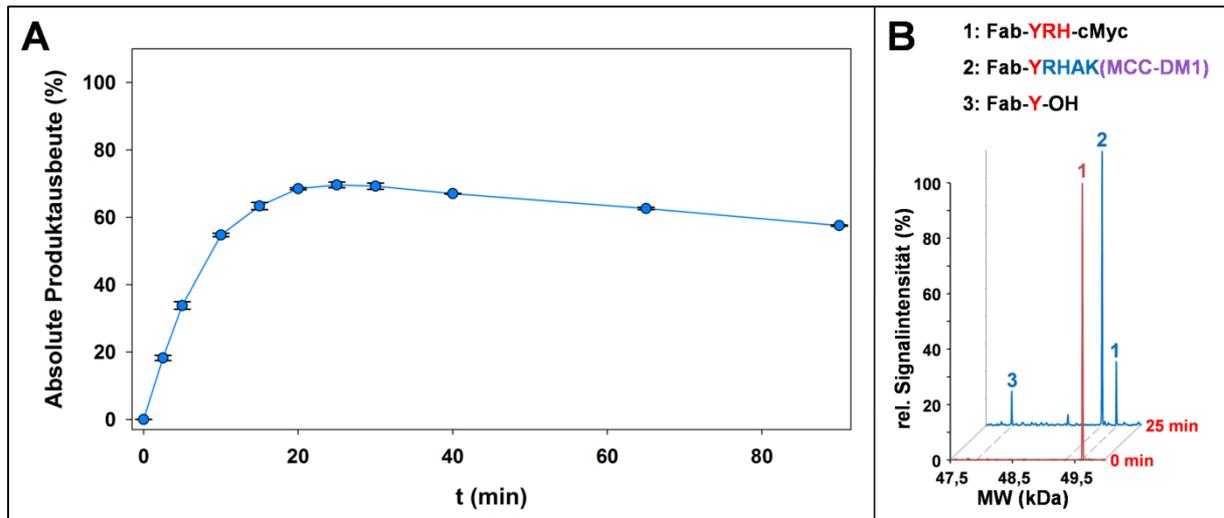


Abbildung 25: Trypsiligase-Variante 2G10-katalysierte Modifizierung des Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmentes Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc mit dem Toxin DM1. A) Progresskurve der Modifizierung von Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc mit DM1. Die Ausbeuten an Aminolyseprodukt wurden als Funktion der Reaktionszeit aufgetragen. Reaktionsbedingungen: 10 μM Trypsiligase-Variante 2G10, 100 μM Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc, 500 μM H-RHAK(MCC-DM1)-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 100 μM ZnCl_2 , pH 7,8 bei $T = 30^\circ\text{C}$. Alle aufgetragenen Messwerte stellen den Mittelwert zweier unabhängig durchgeführten Messungen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittlere absolute Abweichung. In Tabelle 33 sind die wichtigsten Parameter der Modifizierungsreaktion zusammengefasst. **B)** Chromatogramm der LC-MS-Analyse für den Reaktionsansatz bei einer Reaktionszeit von 0 und 25 min. Peak 1: Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc ($M_{\text{ber.}}$: 49580,4 Da; $M_{\text{gef.}}$: 49580 ± 1 Da), Peak 2: Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(MCC-DM1)-OH ($M_{\text{ber.}}$: 49352,5 Da; $M_{\text{gef.}}$: 49353 ± 1 Da); Peak 3: Anti-Her2-Fab-TAAY-OH ($M_{\text{ber.}}$: 47902,5 Da; $M_{\text{gef.}}$: 47900 ± 1 Da).

Modifizierung von Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc

Als zweites Anwendungsbeispiel wurde das TNF α -spezifische Fab-Fragment Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc enzymkatalysiert mit Carboxyfluorescein sowie einem 20 kDa schweren Polyethylenglykol (PEG20k) modifiziert. Bei der Analytik der Modifizierungsreaktion mit dem Carboxyfluorescein-beladenen Nukleophil, welche mittels hydrophober Interaktionschromatographie erfolgte, eluierten Edukt und Hydrolyseprodukt bei identischem Volumen. Somit konnten nur die Ausbeute des Aminolyseproduktes sowie die Aminolysegeschwindigkeit bestimmt werden. Mit einer Produktausbeute von 65,9 % sowie einer Aminolysegeschwindigkeit von $0,0131 \text{ s}^{-1}$ ergaben sich auch hier vergleichbare Ergebnisse wie bei der Modifizierung von Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc mit Carboxyfluorescein (Abb. 26A und Tab. 34). Die quantitative Auswertung zum zeitlichen Verlauf der Produktbildung bei der Modifizierung von Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc mit dem PEG-beladenen Nukleophil H-RHAK(PEG20k)AAK(DNP)-OH erfolgte densitometrisch anhand des SDS-Polyacrylamidgels, welches mittels Coomassie angefärbt wurde (Abb. 26A und C). Auch hier korrelierten die erhaltenen Ergebnisse mit den Daten der vorangegangenen Modifizierungen. So konnte für die kovalente Kopplung des PEG-Derivates eine maximale Produktausbeute

von 70,5 % erzielt werden, wobei das Aminolyse- zu Hydrolyseverhältnis 11,9 betrug. In fortführenden Arbeiten sollte die strukturelle Integrität der modifizierten Fab-Fragmente durch Funktionalitätsstudien mit einem korrespondierenden Antigen überprüft werden.

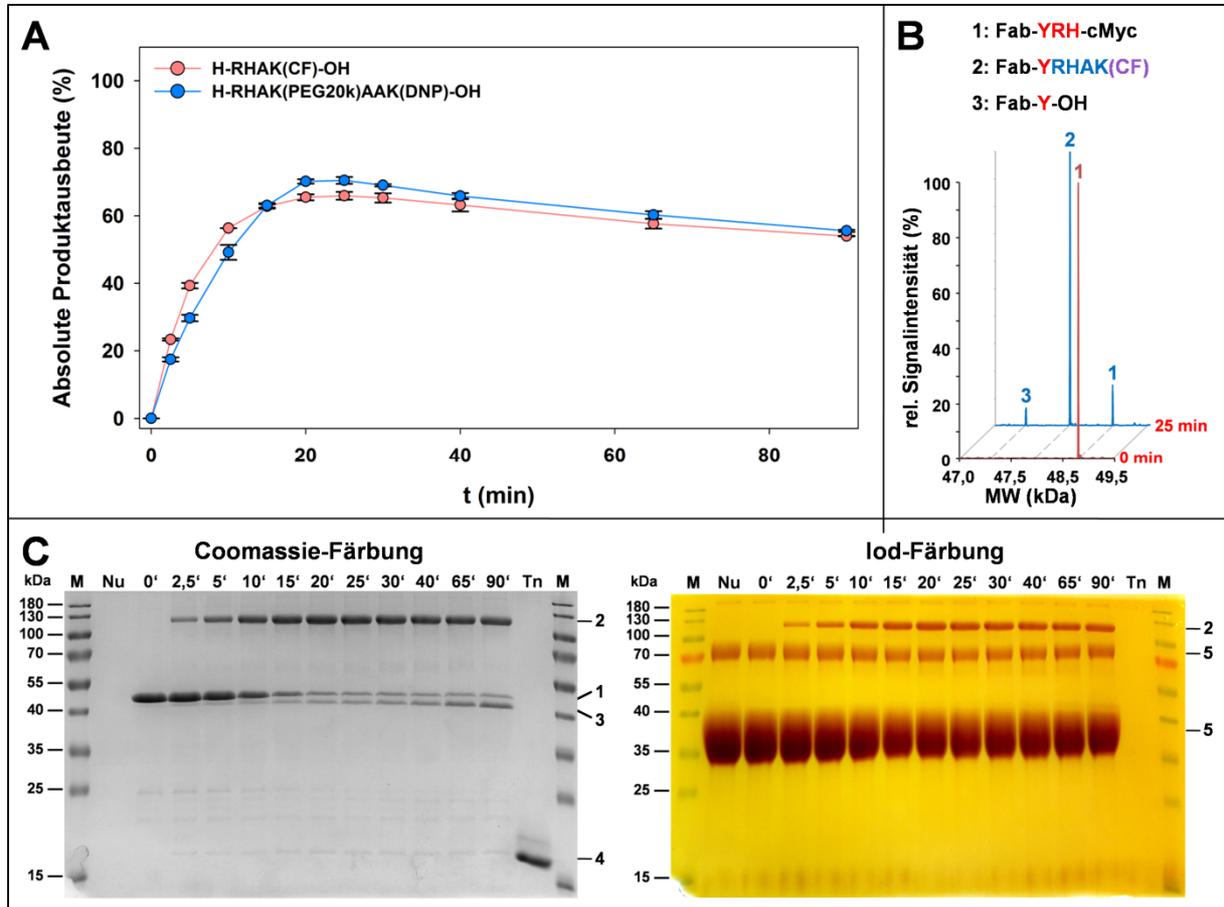


Abbildung 26: Trypsiligase-Variante 2G10-katalysierte Modifizierung des TNF α -spezifischen Fab-Fragmentes Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc mit Carboxyfluorescein sowie Polyethylenglykol. A) Progresskurve der Modifizierung von Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc mit jeweils fünf Äquivalenten des Nucleophils H-RHAK(CF)-OH sowie H-RHAK(PEG20k)AAK(DNP)-OH. Die Ausbeuten an Aminolyseprodukt wurden als Funktion der Reaktionszeit aufgetragen. Reaktionsbedingungen: 10 μ M Trypsiligase-Variante 2G10, 100 μ M Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc, 500 μ M Nucleophil in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μ M ZnCl₂, pH 7,8 bei T = 30 °C. Alle aufgetragenen Messwerte stellen den Mittelwert zweier unabhängig durchgeführten Messungen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittlere absolute Abweichung. In Tabelle 34 sind die wichtigsten Parameter der Modifizierungsreaktion zusammengefasst. **B)** Chromatogramm der LC-MS-Analyse für die Modifizierung von Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc mit Carboxyfluorescein. Analysiert wurde der Reaktionsansatz bei einer Reaktionszeit von 0 und 25 min. Peak 1: Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc ($M_{\text{ber.}}$: 49261,1 Da; $M_{\text{gef.}}$: 49261 \pm 1 Da), Peak 2: Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(CF)-OH ($M_{\text{ber.}}$: 48434,2 Da; $M_{\text{gef.}}$: 48433 \pm 1 Da); Peak 3: Anti-TNF α -Fab-TAAY-OH ($M_{\text{ber.}}$: 47583,3 Da; $M_{\text{gef.}}$: 47581 \pm 1 Da). **C)** Gel der SDS-PAGE-Analyse der Modifizierung von Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc mit Polyethylenglykol bei 0, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60 sowie 90 min. Die Visualisierung einzelner Peptid- und Proteinspezies erfolgte durch Färbung mittels Coomassie (links) sowie Iod (rechts). M: Marker PageRuler prestained protein ladder; Nu: Nucleophil; Tn: Trypsiligase-Variante 2G10. Bande 1: Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc; Bande 2: Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(PEG20k)AAK(DNP); Bande 3: Anti-TNF α -Fab-TAAY-OH; Bande 4: Trypsiligase-Variante 2G10; Bande 5: H-RHAK(PEG20k)AAK(DNP)-OH.

Tabelle 34: Übersicht zur Modifizierung des Fab-Fragmentes Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc mit H-RHAK(CF)-OH und H-RHAK(PEG20k)AAK(DNP)-OH, katalysiert durch die Trypsiligase-Variante 2G10. AP: maximale Ausbeute Aminolyseprodukt, HP: Ausbeute Hydrolyseprodukt bei maximalem AP, AL: Aminolysereaktion, HL: Hydrolysereaktion, n. b.: nicht bestimmbar.

Molare Äquivalente Nukleophil	AP (%)	HP (%)	$k_{\text{cat,AL}}^{\text{app}}$ (s ⁻¹)	$k_{\text{cat,HL}}^{\text{app}}$ (s ⁻¹)	$k_{\text{cat,AL}}^{\text{app}} : k_{\text{cat,HL}}^{\text{app}}$
Modifizierung mit H-RHAK(CF)-OH					
5	65,9 ± 1,1	n.b.	0,0131 ± 0,0014	-	-
Modifizierung mit H-RHAK(PEG20k)AAK(DNP)-OH					
5	70,5 ± 1,0	14,4 ± 0,4	0,0116 ± 0,0000	0,0010 ± 0,0001	11,9

4.6.3 Präparative Reinigung modifizierter Fab-Fragmente

Für die Durchführung der Studien zur Funktionalität der modifizierten Fab-Fragmente wurden diese zunächst durch einen chromatographischen Reinigungsschritt isoliert. Für Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(CF) sowie Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(CF) erfolgte die Reinigung der Syntheseprodukte in einem Einschrittverfahren mittels HIC wie unter 3.3.3.2 (S. 61) beschrieben. In Abbildung 27 ist beispielhaft die HIC-basierte Reinigung für das 5(6)-Carboxyfluorescein modifizierte Anti-Her2-Fab-Fragment gezeigt. Hierbei konnte das gewünschte Transamidierungsprodukt Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(CF), für welches zwei Produktpeaks (Abb. 27A, Peak c) gefunden wurde, vom Biokatalysator (Abb. 27A, Peak d) sowie dem unmodifizierten Fab-Fragment (Abb. 27A, Peak b) und dem Hydrolyseprodukt (Abb. 27A, Peak a) abgetrennt werden.

Der Grund für den Doppelpeak des Transamidierungsproduktes lag im verwendeten 5(6)-Carboxyfluorescein, welches ein Gemisch aus den beiden Konstitutionsisomeren 5-Carboxyfluorescein und 6-Carboxyfluorescein darstellt. Beide Produktpeaks wurden aufgefangen, vereinigt und gegen Puffer C (vgl. 2.2, S. 35) umgepuffert sowie konzentriert. Das korrekte Transamidierungsprodukt konnte massenspektrometrisch bestätigt werden (Abb. 27C). Für die Reinigung von Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(CF) ergab sich ein vergleichbares Elutionsprofil. Die Aufarbeitung erfolgte wie für Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(CF).

Für die Isolation des Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(MCC-DM1) wurde eine Zweischrittreinigung durchgeführt, welche aus einer Kationenaustauschchromatographie (vgl. 3.3.3.1, S. 61) sowie einer nachfolgenden hydrophoben Interaktionschromatographie (vgl. 3.3.3.2, S. 61) bestand. Grund hierfür war eine unzureichende Trennung von Trypsiligase-Variante 2G10 und dem gewünschten Transamidierungsprodukt Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(MCC-DM1) bei Einschrittreinigung mittels hydrophober Interaktionschromatographie.

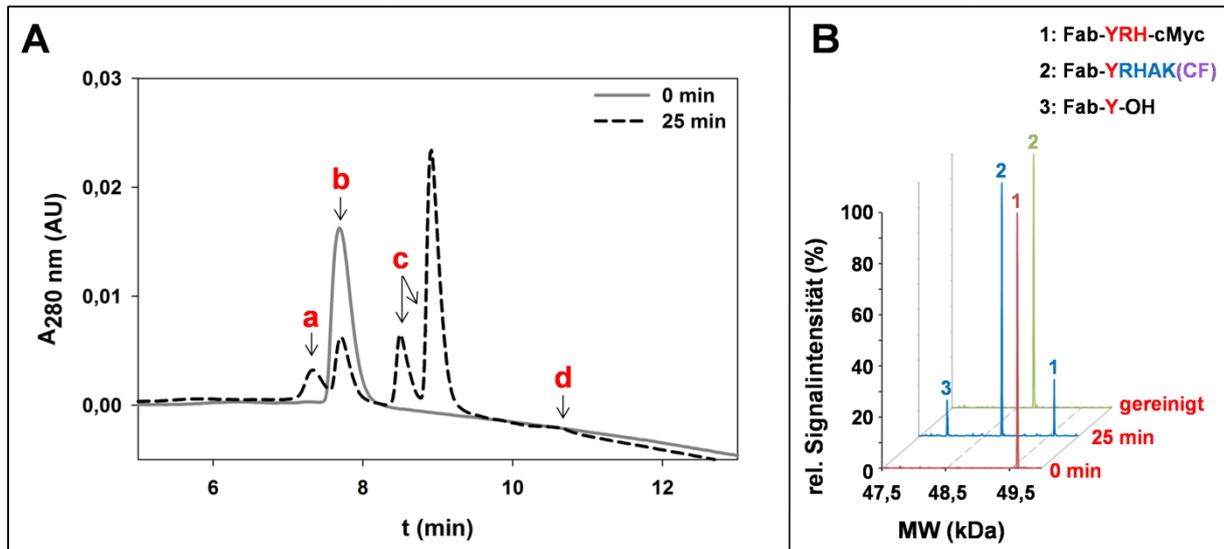


Abbildung 27: Präparative Reinigung des mit 5(6)-Carboxyfluorescein markierten Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmentes Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(CF) mittels hydrophober Interaktionschromatographie. **A)** Elutionsprofil zur Separation des mit 5(6)-Carboxyfluorescein modifizierten Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(CF) (c) vom unmodifizierten Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc (b) sowie dem Hydrolyseprodukt Anti-Her2-Fab-TAAY-OH (a) und der Trypsiligase-Variante 2G10 (d). Reaktionsbedingungen: 10 μ M Trypsiligase-Variante 2G10, 100 μ M Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc, 500 μ M H-RHAK(CF)-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μ M ZnCl₂, pH 7,8 bei T = 30 °C, Reaktionszeit 0 min (grau) und 25 min (schwarz gestrichelt). **B)** LC-MS-Analyse für den Reaktionsansatz bei einer Reaktionszeit von 0 und 25 min sowie für das gereinigte Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(CF). Peak 1: Anti-Her-Fab-TAAYRHAK-cMyc ($M_{\text{ber.}}$: 49580,4 Da; $M_{\text{gef.}}$: 49581 \pm 1 Da); Peak 2: Anti-Her-Fab-TAAYRHAK(CF) ($M_{\text{ber.}}$: 48753,4 Da; $M_{\text{gef.}}$: 49754 \pm 1 Da); Peak 3: Anti-Her-Fab-TAAY-OH ($M_{\text{ber.}}$: 47902,5 Da; $M_{\text{gef.}}$: 47903 \pm 1 Da).

Der Verlauf der Zweischrittreinigung ist in Abbildung 28 dargestellt. Im ersten Reinigungsschritt konnten mittels Kationenaustauschchromatographie (Abb. 28A) der Biokatalysator (Elution bei ca. 1,5-3 ml) sowie das freie Nukleophil (Elution bei ca. 4-9 ml) von den im Reaktionsansatz befindlichen Fab-Fragmentspezies (Elution bei ca. 10-13 ml) abgetrennt werden. Nach Vereinigung der Fraktionen A11-A12 und B12-B11 erfolgte die Isolierung des DM1-modifizierten Fab-Fragmentes mittels HIC (Abb. 28B). So konnte das gewünschte Transamidierungsprodukt Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(MCC-DM1) (Abb. 28B, Peak b) mit einem Elutionsvolumen von 26-31 ml erfolgreich von der hydrolysierten sowie unmodifizierten Fab-Fragmentspezies (Abb. 28B, Peak b) abgetrennt werden. Diese eluierten bei einem Volumen von 18-21 ml. Schließlich wurden die Fraktionen C4-C7 vereinigt und gegen Puffer C (vgl. 2.2, S. 35) umgepuffert sowie konzentriert. Das korrekte Transamidierungsprodukt konnte massenspektrometrisch bestätigt werden (Abb. 28C).

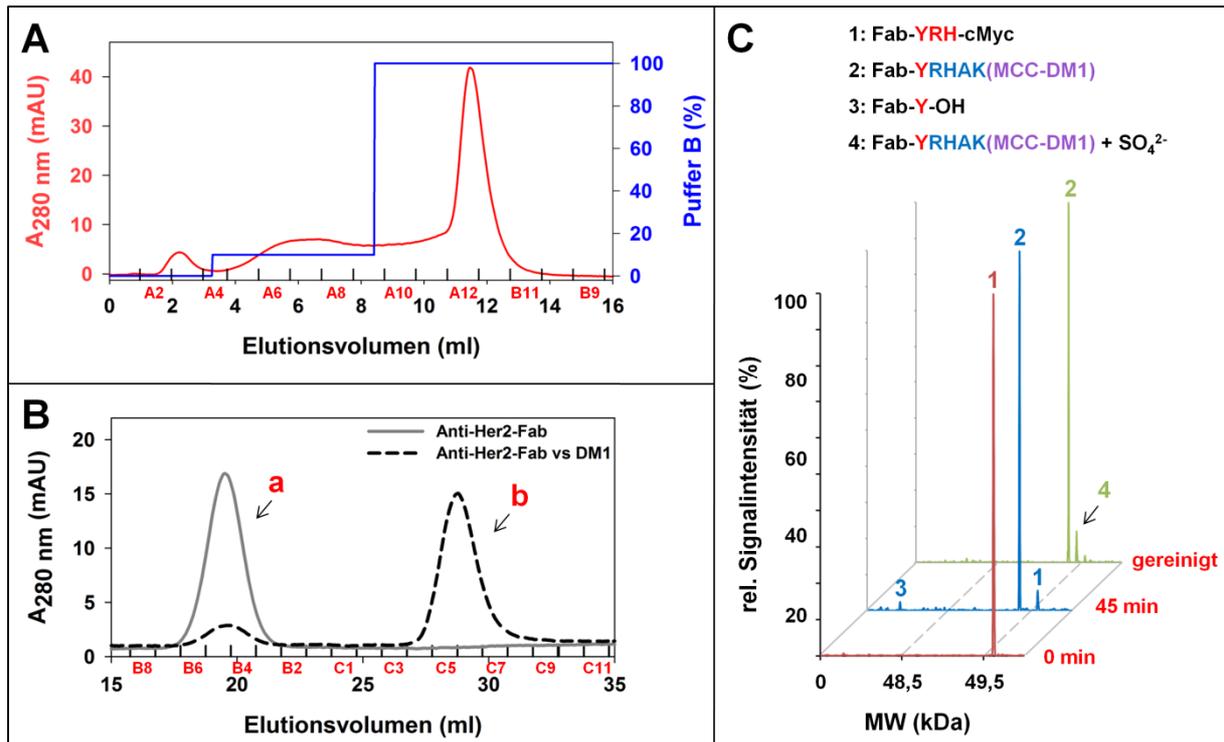


Abbildung 28: Präparative Reinigung des mit DM1 markierten Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmentes Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(MCC-DM1) mittels Zweischrittreinigung. **A)** Chromatogramm der Kationenaustauschchromatographie zur Separation der modifizierten sowie unmodifizierten Fab-Fragmentspezies von Trypsiligase-Variante 2G10 sowie dem DM1-beladenen Nukleophil. **B)** Elutionsprofil zur Separation des mit DM1-modifizierten Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(MCC-DM1) (b) vom unmodifizierten Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc sowie dem Hydrolyseprodukt Anti-Her2-Fab-TAAY-OH (a). Reaktionsbedingungen: 10 μ M Trypsiligase-Variante 2G10, 100 μ M Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc, 1000 μ M H-RHAK(MCC-DM1)-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μ M ZnCl₂, pH 7,8 bei T = 30 °C, Reaktionszeit 45 min. **C)** Chromatogramm der LC-MS-Analyse für den Reaktionsansatz bei einer Reaktionszeit von 0 und 45 min sowie für das gereinigte Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(CF). Peak 1: Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc ($M_{\text{ber.}}$: 49580,4 Da; $M_{\text{gef.}}$: 49581 \pm 1 Da); Peak 2: Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(MCC-DM1) ($M_{\text{ber.}}$: 49352,5 Da; $M_{\text{gef.}}$: 49358 \pm 1 Da); Peak 3: Anti-Her2-Fab-TAAY-OH ($M_{\text{ber.}}$: 47902,5 Da; $M_{\text{gef.}}$: 47902 \pm 1 Da); Peak 4: Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(MCC-DM1) + SO₄²⁻ ($M_{\text{ber.}}$: 49448,6 Da; $M_{\text{gef.}}$: 49456 \pm 1 Da).

Das PEG-konjugierte Fab-Fragment Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(PEG20k)AAK(DNP)) wurde durch ein Zweischrittreinigungsverfahren, welches sich aus einer Protein G-basierten Affinitätschromatographie (vgl. 3.3.3.3, S. 62) sowie einer darauffolgenden Größenausschlusschromatographie (vgl. 3.3.3.4, S. 62) zusammensetzte, gereinigt. Der Reinigungsverlauf ist in Abbildung 29 gezeigt, wobei die Analyse der einzelnen Reinigungsschritte mittels SDS-PAGE erfolgte. Für die Visualisierung aller PEG-Spezies (dies sind das Nukleophil H-RHAK(PEG20k)AAK(DNP) sowie das Transamidierungsprodukt Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(PEG20k)AAK(DNP)) wurde das Polyacrylamidgel zunächst in einer gesättigten ethanolischen Iodlösung inkubiert. Anschließend erfolgte eine Visualisierung aller Proteine durch eine Coomassie-Färbung. Im ersten Reinigungsschritt mittels Protein G-Affinitätschromatographie (Abb. 29A) konnten sowohl der Biokatalysator als auch das freie PEG-Nukleophil vom Fab-Fragment abgetrennt werden. Wie in Abbildung 29C ersichtlich ist, befanden sich Enzym und Nukleophil ausschließlich in der Durchlaufraction (DL). Das

pegylierte Fab-Fragment, welches im Polyacrylamidgel eine distinkte Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 130 kDa aufweist, konnte gemeinsam mit der unmodifizierten sowie hydrolysierten Fab-Fragmentspezies eluiert werden und fand sich in den Fraktionen 29-31 wieder.

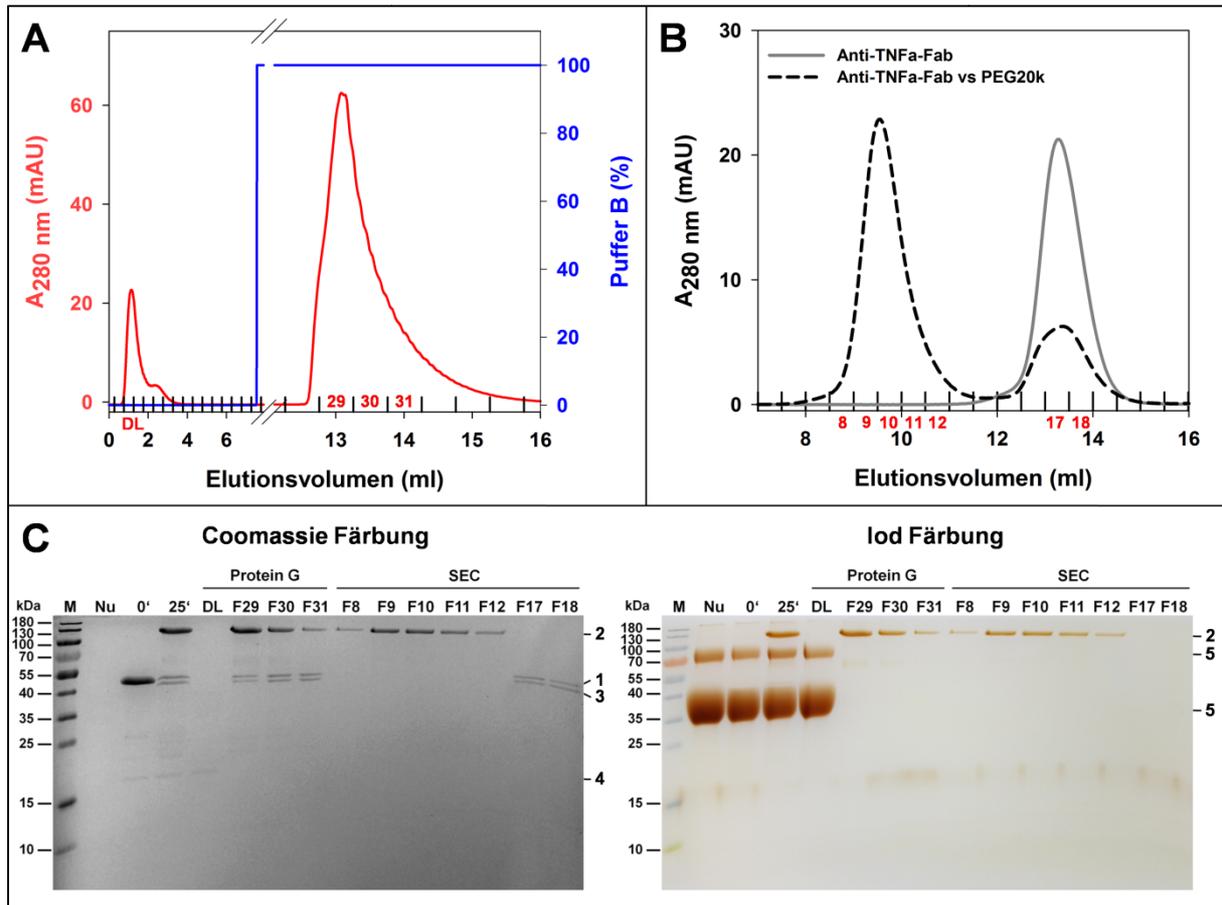


Abbildung 29: Präparative Reinigung des mit Polyethylenglykol modifizierten TNF α -spezifischen Fab-Fragmentes Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(PEG20k)AAK(DNP) mittels Zweischnittreinigung. **A**) Chromatogramm der Protein G-basierten Affinitätschromatographie zur Separation der modifizierten sowie unmodifizierten Fab-Fragmente von Trypsilignase-Variante 2G10 sowie dem PEG-beladenen Nukleophil. Reaktionsbedingungen: 10 μ M Trypsilignase-Variante 2G10, 100 μ M Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc, 500 μ M H-RHAK(PEG20k)AAK(DNP)-OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μ M ZnCl₂, pH 7,8 bei T = 30 °C, Abstoppen der Reaktion nach 25 min mit 2 mM EDTA. **B**) Separation des pegylierten Fab-Fragmentes von der unmodifizierten sowie hydrolysierten Fab-Spezies mittels Größenausschlusschromatographie **C**) Gel der SDS-PAGE-Analyse einzelner Fraktionen aus der Zweischnittreinigung mittels Protein G-basierter Affinitätschromatographie sowie SEC. Die Visualisierung einzelner Peptid- und Proteinspezies erfolgte durch Färbung mittels Coomassie (links) sowie Iod (rechts). M: Marker PageRuler prestained protein ladder; DL: Durchlauf; Nu: Nukleophil; 0' und 25': Reaktionsansatz bei 0 und 25 min Reaktionszeit. Bande 1: Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc; Bande 2: Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(PEG20k)AAK(DNP); Bande 3: Anti-TNF α -Fab-TAAY-OH; Bande 4: Trypsilignase-Variante 2G10; Bande 5: H-RHAK(PEG20k)AAK(DNP)-OH.

Bei der Visualisierung mittels Iod konnte in den Elutionsfraktionen kein freies PEG-Nukleophil detektiert werden. Die Abtrennung des pegylierten Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(PEG20k)AAK(DNP) von den weiteren Fab-Fragmentspezies erfolgte im zweiten Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie. Wie in Abbildung 29B er-

sichtlich ist, konnte das gewünschte Transamidierungsprodukt aufgrund des größeren hydrodynamischen Radius vom Edukt und Hydrolyseprodukt isoliert werden. Dies konnte durch die SDS-PAGE-Analyse der einzelnen Elutionsfraktionen bestätigt werden. Schließlich wurden die Fraktionen 8-12 vereinigt und konzentriert. Die modifizierten und zur Homogenität gereinigten Fab-Fragmente wurden für fortführende Studien zur Funktionalität eingesetzt.

4.6.4 Studien zur Funktionalität modifizierter Fab-Fragmente

Im Weiteren sollte gezeigt werden, dass die enzymkatalysierte Modifizierung ausgewählter Fab-Fragmente keinen Einfluss auf deren Fähigkeit zur Antigenbindung und damit auf deren strukturelle und funktionelle Integrität hat. Hierzu wurden die Bindungsaffinitäten der zuvor gereinigten Fab-Derivate für deren Antigene mittels konzentrationsabhängigem *ELISA* bestimmt. Die Durchführung des *ELISA*'s erfolgte wie unter 3.3.4.3 beschrieben. Für die funktionalisierten Konjugate des Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmentes wurde als Antigenstruktur anstelle der ektodermalen Domäne des Her2/neu Rezeptors ein *N*-terminal biotinyliertes Peptid mit der Sequenz Biotin-LLGPYELWELSH-OH verwendet. Mittels Phagen-Displays konnte dieses Peptid, ausgehend von einer 12-mer Peptidbibliothek als mimetisches Epitop für Trastuzumab selektiert werden.^[189] Für die Durchführung des *ELISA*'s wurde das Peptid auf einer Streptavidin-beschichteten *96-well*-Mikrotiterplatte (MTP) der Firma Pierce (vgl. 2.11, S. 46) zu 100 ng je Kavität immobilisiert. Für die funktionalisierten Konjugate des TNF α -spezifischen Fab-Fragmentes wurden TNF α in einer Nunc MaxiSorp Mikrotiterplatte mit 100 ng je Kavität immobilisiert. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden die Fab-Fragmente in seriellen Verdünnungen mit den immobilisierten Liganden inkubiert und mittels HRP-konjugiertem Fab-spezifischen Antikörper quantifiziert. Die erhaltenen Signalintensitäten wurden gegen die logarithmierte Ligandenkonzentrationen aufgetragen (Abb. 30). Anschließend erfolgte eine nichtlineare Regressionsanalyse mittels Gleichung 3. Aus den ermittelten Wendepunkten wurden die Dissoziationskonstanten der einzelnen Fab-Fragmente bestimmt. Diese sind in Tabelle 35 und 36 zusammengefasst. Die Dissoziationskonstanten der verschiedenen Her2/neu-spezifischen Fab-Fragmente liegen mit 0,78-1,61 μ M in einem zueinander vergleichbaren Wertebereich. Gleiches gilt für das TNF α -spezifische Fab-Fragment und dessen enzymatisch modifizierten Konjugaten, bei denen die Dissoziationskonstanten zwischen 1,18 und 1,79 nM liegen. Somit lässt sich festhalten, dass die Trypsin-Variante 2G10-katalysierte Modifizierung von Anti-Her2-TAAYRH-cMyc und Anti-TNF α -TAAYRH-

cMyc mit unterschiedlichen Nukleophilen keinen Einfluss auf deren Fähigkeit zur Antigenbindung hat.

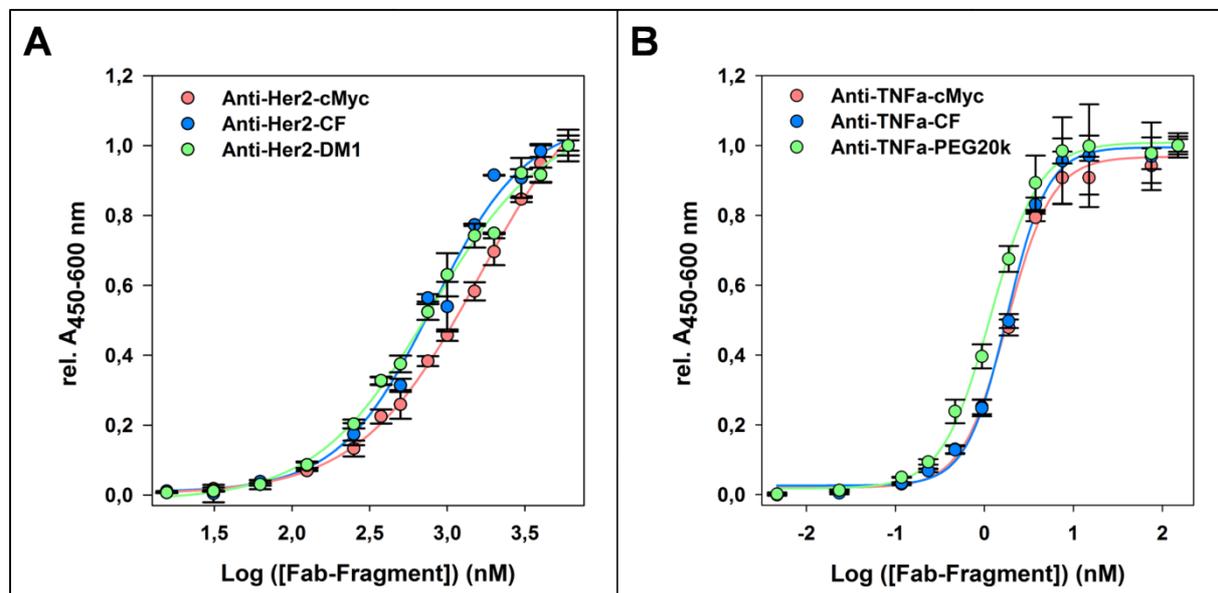


Abbildung 30: ELISA-basierte Bindungsanalyse für funktionalisierte Her2/neu- sowie TNF α -spezifische Fab-Fragmente. Dargestellt ist ein konzentrationsabhängiger ELISA für die nativen und funktionalisierten Her2/neu- sowie TNF α -spezifischen Fab-Fragmente. Für Her2/neu-spezifische Fab-Fragmente wurde das Peptid Biotin-LLGPYELWELSH-OH als Ligand auf einer Steptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte immobilisiert. Für TNF α -spezifische Fab-Fragmente wurde TNF α auf einer MaxiSorp Mikrotiterplatte immobilisiert. Die Detektion der gebundenen Fab-Fragmente erfolgte durch einen HRP-konjugierten Fab-spezifischen Antikörper. Die erhaltenen Signalintensitäten wurden gegen die logarithmierte Fab-Konzentration aufgetragen. Die Dissoziationskonstanten wurden durch eine nicht lineare Regressionsanalyse mittels Gleichung 3 ermittelt. Diese sind in Tabelle 35 und 36 zusammengefasst. Alle aufgetragenen Signalintensitäten stellen den Mittelwert von drei unabhängig durchgeführten Messreihen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

Tabelle 35: Übersicht zu ermittelten Dissoziationskonstanten für das Her2/neu-spezifische Fab-Fragment und dessen enzymatisch funktionalisierten Konjugaten.

Fab-Fragment	K_D (μ M)
Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc	$1,62 \pm 0,15$
Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(CF)	$0,80 \pm 0,10$
Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(MCC-DM1)	$0,78 \pm 0,07$

Tabelle 36: Übersicht zu ermittelten Dissoziationskonstanten für das TNF α -spezifische Fab-Fragment und dessen enzymatisch funktionalisierter Konjugate.

Fab-Fragment	K_D (nM)
Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc	$1,79 \pm 0,12$
Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(CF)	$1,79 \pm 0,10$
Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(PEG20K)AAK(DNP)	$1,18 \pm 0,06$

5 Diskussion

Mit dem Ziel, eine effiziente Biokatalyseplattform zur Herstellung von ADCs zu etablieren, wurde in der AG BORDUSA im Rahmen eines rationalen Enzym-Engineerings eine Trypsinvariante entwickelt, die als Trypsiligase bezeichnet wird und sowohl die *N*-, als auch *C*-terminale Modifizierung von Proteinen ermöglicht.^[129,131,154] Trypsiligase besitzt eine ausgeprägte Spezifität für die Tripeptidsequenz YRH, wobei sie die Peptidbindung zwischen Tyrosin und Arginin in Gegenwart zweiwertiger Metallionen spaltet. Unter Verwendung derivatisierter Substratmimetika des 4-Guanidinophenylester-Types ermöglicht Trypsiligase eine quantitative Modifizierung von Zielproteinen und Peptiden, welche am *N*-Terminus über ein Arg-His-Motiv (RH-) verfügen. Der 4-Guanidinophenylester dient als Acyldonor und das Zielprotein mit *N*-terminalem RH-Motiv als Nukleophil und somit als Acylakzeptor. Das entstehende Produkt ist gegenüber einer Sekundärhydrolyse durch Trypsiligase inert, da dieses nicht über die Erkennungssequenz YRH verfügt. Im Gegensatz hierzu ergibt sich bei der *C*-terminalen Proteinmodifikation via Transamidierungsreaktion eine Limitierung bei der Produktausbeute. Hierbei wird das Zielprotein am *C*-Terminus mit der Erkennungssequenz YRH ausgestattet und dient folglich als Acyldonor. Wie in Kapitel 1.3 (S. 22) ausführlich beschrieben, wird die Produktausbeute durch zwei Faktoren beschränkt:

- (i) durch Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediates via Hydrolysereaktion, welche insbesondere bei niedrigen Substrat- und Nukleophilkonzentrationen als Nebenreaktion zur Aminolysereaktion stattfindet und
- (ii) durch Rekonstitution der Erkennungssequenz YRH im gewünschten Transamidierungsprodukt, wodurch dieses wiederum als Acyldonor für Trypsiligase zur Verfügung steht und entsprechend je nach Acylakzeptor zum Hydrolyseprodukt oder erneuten Transamidierungsprodukt weiter reagieren kann.

Das fortführende Ziel ist eine weitere Optimierung von Trypsiligase zugunsten der katalysierten Transamidierungsreaktion, die zur *C*-terminale Modifizierung anspruchsvoller therapeutischer Zielproteine angewendet werden soll. Diesbezüglich konnte im Rahmen der Dissertation von Frau S. GISSEL das Phagen-Display als Methode zum evolutionären Engineering von Trypsiligase initial etabliert werden (vgl. 1.3, S. 22). Als *proof of principle* wurde eine kombinatorische Trypsiligase-basierte Bibliothek mit fünf randomisierten Aminosäurepositionen (S61, R62, Q64, S190 und Q192) eingesetzt. Die Auswahl der Randomisierungsstellen erfolgte aufgrund der Annahme, dass die Schaffung eines hydrophoben Clusters im Bereich des

aktiven Zentrums die Einbindung des hydrolytisch aktiven Wassermoleküls erschwert, welches im Deacylierungsschritt das Acyl-Enzym-Intermediat nukleophil angreift und zu dessen Hydrolyse führt. Diese Hypothese basiert auf der Architektur des aktiven Zentrums der natürlich vorkommenden Transpeptidase Sortase A, bei welcher sich die katalytische Triade innerhalb einer hydrophoben Spalte befindet, welche möglicherweise die Zugänglichkeit für Wasser als potentiell Nukleophil erschwert.^[190–192] Im Rahmen der durchgeführten Selektion mittels Phagen-Display gelang es, zwei Trypsiligase-Varianten zu isolieren, welche über ein um Faktor 2 verbessertes Aminolyse- zu Hydrolyseverhältnis verfügten, was jedoch zu einer nur unwesentlich verbesserten Produktausbeute führte. Als Hindernis für die Isolierung von Trypsiligase-Varianten mit verbesserter Syntheseeffizienz erwies sich die Tatsache, dass mit dem etablierten Phagen-Display lediglich eine Selektionsrunde durchgeführt werden konnte. Dies stellt für die effiziente Selektion verbesserter Biokatalysatoren einen stark limitierenden Faktor dar, da eine effektive Amplifikation verbesserter Biokatalysatoren erst durch mehrere Selektionsrunden sowie durch eine damit realisierbare Erhöhung des Selektionsdruckes ermöglicht wird.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Rahmenbedingungen zur Anreicherung und Identifizierung von Trypsiligase-Varianten mit verbesserten Syntheseigenschaften optimiert werden. Dies umfasste die Konstruktion einer qualitativ hochwertigen DNA-Bibliothek, die Optimierung des Selektionsverfahrens mittels Phagen-Display sowie die Etablierung eines *ELISA*-basierten Hochdurchsatz-Screenings, welches die Durchmusterung einer Vielzahl von selektierten Enzymvarianten hinsichtlich einer verbesserten Syntheseeffizienz erlaubt.

Identifizierte Biokatalysatoren sollten rekombinant hergestellt und initial hinsichtlich der katalysierten Transamidierungsreaktion charakterisiert werden. Für die vielversprechendste Trypsiligase-Variante erfolgte eine detaillierte Charakterisierung, welche Studien zur Spezifität, Stabilität und Funktionalität umfasste. Eine mögliche anwendungsorientierte Verwertung des optimierten Biokatalysators für die Erzeugung therapeutischer Proteine sollte exemplarisch gezeigt werden. In Anlehnung an die gewünschte Herstellung ortsspezifisch modifizierter Antikörper-Toxin-Konjugate (ADC) sollten zwei Fab-Fragmente beispielhaft mit diversen Funktionalitäten enzymkatalysiert modifiziert und ein eventueller Einfluss auf deren Funktionalität überprüft werden.

5.1 Optimierung der Rahmenbedingungen zur Anreicherung und Identifizierung verbesserter Trypsiligase-Varianten

Die Gründe für die Einschränkung hinsichtlich der Anzahl durchführbarer Selektionsrunden beim etablierten Phagen-Display lagen in der geringen Qualität der erzeugten Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek als Resultat der verwendeten NNK-Motiv-basierten Randomisierungsstrategie und dem eingesetzten Phagemiden, bei dem ein *tac*-Promotor die Genexpression regulierte. Die Kombination aus geringer Bibliotheksqualität sowie Phagemid mit *tac*-Promotor, bei welchem auch in Abwesenheit eines Induktors eine basale Transkription des Zielgens auftritt, führte letztlich zum gehäuftem Auftreten sogenannter *escape*-Mutanten, die bereits nach einer Selektionsrunde die dominierende Spezies innerhalb des *pools* an Trypsiligase-Varianten darstellten.^[193] Dies sind nicht funktionale Bibliotheksvarianten, welche über Genmutationen verfügen, die während der Proteinbiosynthese zu fehlerhaften Translationsprodukten führen. Dies verschafft *E. coli*-Zellen, welche über ein Phagemid mit *escape*-Mutante verfügen, einen deutlichen Wachstumsvorteil während des Kultivierungsschrittes von Phagemid-tragenden *E. coli*-Zellen bei der Propagierung von Phagen, insbesondere wenn durch den eingesetzten Phagemid eine geringfügige basale Transkription stattfindet. Ausschlaggebend hierfür ist eine verminderte Wachstumsgeschwindigkeit bei *E. coli*-Zellen, welche über Phagemide verfügen, die für funktionales pIII-Fusionsprotein codieren. Deren verminderte Wachstumsgeschwindigkeit ergibt sich daraus, dass bereits eine geringfügige basale Expression des pIII-Fusionsproteins eine metabolische sowie toxische Last bei *E. coli*-Zellen induziert.^[194] Bei *E. coli*-Zellen, welche über Phagemide verfügen, die für *escape*-Mutanten codieren, ist dies nicht der Fall, sodass diese keine verminderte Wachstumsgeschwindigkeit besitzen und somit im Zuge der Kultivierung angereichert werden.^[194] Als Quelle für die Entstehung von *escape*-Mutanten sind die Konstruktion der DNA-Bibliothek sowie die eingesetzte Randomisierungsstrategie zu betrachten. Für die Konstruktion der DNA-Bibliothek von Frau GISSEL wurde eine NNK-Motiv-basierte Randomisierungsstrategie gewählt, bei der das Basentriplett der zu randomisierenden Aminosäureposition ein NNK-Motiv aufweist. In N-Position werden alle vier Basen und in K-Position lediglich Guanin und Thymin zugelassen, sodass letztlich 32 der 64 möglichen Codons vorkommen können. Diese beinhalten ein Stop-Codon (TAG) und codieren weiterhin für alle kanonischen, proteinogenen Aminosäuren. Die *escape*-Mutanten können wie folgt klassifiziert werden:

- (i) es handelt sich um Bibliotheksvarianten mit einem unerwünschten Stop-Codon an einer oder mehreren Randomisierungspositionen, welches im Rahmen der Proteinbiosynthese zu einem vorzeitigen Abbruch bei der Translation des Fusionsproteins führt, und
- (ii) es handelt sich um eine Bibliotheksvariante mit einer Leserahmenverschiebung (*frameshift*) innerhalb des offenen Leserahmens, welche durch Insertion oder Deletion von Basen entsteht.

Eine solcher *frameshift* wird zu meist durch *primer* eingeführt, welche während der Bibliotheks-konstruktion zur Amplifikation von Genabschnitten oder zur Einführung gewünschter Mutationen verwendet werden. Der Einbau unerwünschter Stop-Codons ist ein Resultat der zugrundeliegenden Randomisierungsstrategie. So ist beispielsweise bei der bereits erwähnten NNK-Motiv-basierten Randomisierungsstrategie der Einbau eines Amber-Stop Codons (TAG) möglich, welches Bestandteil der 32 zugelassenen Codons je Randomisierungsposition ist. Werden fünf Aminosäurepositionen, wie in der Arbeit von Frau GISSEL, via NNK-Motiv randomisiert, besitzt statistisch gesehen jede sechste Bibliotheksvariante mindestens ein Stop-Codon und ist entsprechend dem *pool an escape*-Mutanten zuzuordnen.

Letztlich war es ein Ziel dieser Arbeit, die Effizienz des Phagen-Displays dahingehend zu optimieren, dass der Anteil an *escape*-Mutanten in der naiven Bibliothek möglichst gering ausfällt und deren Anreicherung im Verlauf der Selektion durch oben beschriebenen Sachverhalt verhindert wird.

Da es sich bei *escape*-Mutanten um Bibliotheksvarianten handelt, welche auf DNA-Ebene über eine *frameshift*-Mutation oder ein unerwünschtes Stop-Codon innerhalb der codierenden Sequenz des Fusionsproteins verfügen, kann deren Anteil durch eine Steigerung der Bibliotheksqualität sowie durch eine alternative Randomisierungsstrategie, welche keinerlei Stop-Codons an den zu randomisierenden Basentriplets zulässt, effizient reduziert werden. Diesen Anspruch erfüllt ein in der Arbeitsgruppe "Künstliche Bindeproteine" (MLU Halle-Wittenberg) etabliertes modulares Bibliotheksdesign, welches die Generierung von DNA-Bibliotheken mit äußerst hoher Qualität erlaubt. Ermöglicht wird dies durch eine Trinukleotid-basierte Randomisierungsstrategie^[184] in Kombination mit einer Leserahmenselektion^[185]. Bei der Trinukleotid-basierten Randomisierungsstrategie erfolgt die Randomisierung gewünschter Aminosäurepositionen durch den Einsatz spezieller Oligonukleotid-*primer*, welche bei der Fragment-basierten Konstruktion der DNA-Bibliothek verwendet werden. So wird während der Synthese der entsprechenden *primer* bei korrespondierenden Basentriplets eine definierte Mixtur von vorgefertigten Trinukleotid-Phosphoramiditen verwendet. Dies erlaubt neben der gezielten Auswahl von Aminosäuren, welche für eine Randomisierung an

den gewünschten Aminosäurepositionen zugelassen werden, eine Vermeidung von Stop-Codons. Dadurch wird die Qualität der Bibliothek wesentlich gesteigert.^[184] Der Anteil unerwünschter *frameshift*-Mutanten wird durch eine Leserahmenselektion während der Herstellung der modularen konstanten und randomisierten Genfragmente reduziert. Maßgeblich hierbei sind die *frameshifts* der Oligonukleotid-*primer*, welche als Artefakte während der Oligonukleotidsynthese entstehen. Da die Oligonukleotid-*primer* für die Generierung der randomisierten Fragmente mittels Klenow-Fragment zum DNA-Doppelstrang aufgefüllt werden, würden sich entsprechende *frameshift*-Mutationen direkt in der DNA-Bibliothek wiederfinden. Auch hier bedingt die Leserahmenselektion eine deutliche Qualitätssteigerung der DNA-Bibliothek und vor allem die Reduktion von *escape*-Mutanten.

Um die Anreicherung von *escape*-Mutanten während der Phagenpropagierung durch *E. coli*-Zellen zu verhindern, wurde die Basalexpression des Phagemids reduziert. Hierzu wurde die Transkription der Expressionskassette, welche für ein Fusionsprotein codiert, unter die Kontrolle eines induzierbaren *tetA*-Promotor/Operators gestellt. Dieser weist eine sehr geringe Basalexpression auf und eignet sich somit für eine effektive Phagenpropagierung ohne Anreicherung von *escape*-Mutanten.^[181,186,194] Als Induktor dient Tetracyclin oder Anhydrotetracyclin. Die Konstruktion geeigneter Phagemidvektoren erfolgte auf Grundlage des Vektors pASK-IBA7plus, welcher über einen *tetA*-Promotor/Operator sowie einen *fl ori* verfügt. Dieser wurde für einen Einsatz als Phagemidvektor mit einer Genkassette ausgestattet, welche für ein Fusionsprotein bestehend aus pelB-Signalsequenz, Trypsiligase, einem flexiblen Linker sowie der C-terminalen Domäne des Phagenhüllproteins pIII (AS 252-406) codiert. Hierbei wurden die beiden Phagemidvektoren pMB-03 und pMB-04, welche sich hinsichtlich des Linkers zwischen Trypsiligase und der C-terminalen Domäne von pIII unterscheiden, konstruiert. So wurde bei pMB-04 der in pMB-03 befindliche *MyCUT*-Linker, welcher mit einem cMyc-*tag* ausgestattet ist, durch eine Wildtyp pIII-Linkersequenz ausgetauscht, wodurch eine hohe Flexibilität zwischen Trypsiligase und ΔpIII gewährleistet werden sollte. Die vollständige sowie funktionale Präsentation von Trypsiligase auf der Oberfläche des Bakteriophagen M13 unter der Verwendung der Phagemidvektoren pMB-03 und pMB-04 wurde schließlich durch eine *ELISA*-basierte Analyse bestätigt. Dadurch wurde zum einen das Vorhandensein des cMyc-*tags* bei pMB-03 tragenden Trypsiligase-Phagen nachgewiesen, welches als Qualitätsmerkmal für eine vollständige Präsentation des Fusionsproteins fungierte und zum anderen wurde die Fähigkeit zur Bindung von Ecotin durch Trypsiligase bei pMB-03- sowie pMB-04 tragenden Trypsiligase-Phagen überprüft. Der Phagemidvektor

pMB-04 wurde letztlich für die Selektion verbesserter Trypsiligase-Varianten via Phagen-Display eingesetzt.

5.2 Anwendung des optimierten evolutionären Enzym-Engineerings zur Selektion und Identifizierung verbesserter Trypsiligase-Varianten

Auf Basis des modularen Bibliotheksdesigns wurde für die Optimierung von Trypsiligase eine qualitativ hochwertige DNA-Bibliothek erzeugt (vgl. 4.1.2, S. 90). Für eine Randomisierung wurden die sechs Aminosäurepositionen H40, A55, K97, L99, S190 und Q192 ausgewählt. Diese befinden sich im Bereich des aktiven Zentrums von Trypsiligase und sind in Abbildung 10 (S. 91) dargestellt. Die Auswahl der Aminosäurepositionen erfolgte nach folgenden Überlegungen:

(i) Die Positionen K97, L99, S190 und Q192 wurden gemäß der Hypothese zur Schaffung eines hydrophoben Clusters im Bereich des aktiven Zentrums ausgewählt, was die Einbindung eines hydrolytisch aktiven Wassermoleküls erschweren soll.

(ii) K97 und L99 befinden sich in der S2-Bindetasche und S190 sowie Q192 in der S1-Bindetasche, womit sie potentiell mit der P1- sowie P2-Aminosäure des Substrates interagieren können. Diese Interaktionen sind nicht nur für die Substrateinbindung und folglich für die Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes von Bedeutung. Sie können auch die Enzymkatalyse selbst beeinflussen, beispielsweise durch die Desolvatation von Enzym und Substrat, der Fixierung des Substrates in der für die Katalyse wichtigen kanonischen Konformation, durch die korrekte Ausrichtung der zu spaltenden Peptidbindung zum Serin 195 der katalytischen Triade und dem Oxyanionenloch oder auch durch die Stabilisierung von Konformationsänderungen während der Ausbildung von Übergangszuständen, wie beispielweise während der Änderung der planaren Geometrie der Peptidbindung hin zur tetrahedralen Geometrie des tetrahedralen Intermediates.^[195]

(iii) Die Auswahl von A55 folgte der Tatsache, dass ein Alanin in Position 55 eine hoch konservierte Aminosäure bei Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen darstellt. Ein Aminosäureaustausch beeinflusst die Hydrolyseaktivität bei Serinproteasen.^[196–198] Grund hierfür ist dessen räumliche Nähe zur Seitenkette von Histidin 57, welches Bestandteil der katalytischen Triade ist. Eine Substitution des Alanins gegen Aminosäuren mit sterisch anspruchsvolleren Seitenketten könnte die Ausrichtung von H57 beeinflussen, was wiederum Einfluss auf dessen Funktion als Base im Kontext der katalytischen Triade hat. Da sich eine Modulation der

Hydrolyseaktivität eventuell positiv auf die Aminolyseaktivität des Biokatalysators auswirken könnte, wurde diese Position für eine Randomisierung ausgewählt.

(iv) Die Position H40 befindet sich am Boden der S2'-Bindetasche. Die Auswahl erfolgte hinsichtlich der Tatsache, dass Histidin 40 Bestandteil der Zymogentriade ist, womit es das Gleichgewicht zwischen Zymogen und aktiver Konformation beeinflussen kann. Dies könnte für die Transamidierungsreaktion eine Rolle spielen, da für Trypsiligase ein Substrat-aktivierter Katalysemechanismus postuliert wird.^[129] Desweiteren moduliert H40 die Architektur der S1'-S3'-Bindetaschen, was wiederum essentiell für die Interaktion mit der P1' und P2'-Aminosäure sein könnte.^[199] Dieser Aspekt ist insofern wichtig, als dass eine effiziente Einbindung des peptidischen Nukleophils die Transamidierungsreaktion begünstigt. Grund hierfür ist, dass das peptidische Nukleophil mit einem Wassermolekül während des Deacylierungsschrittes um eine Einbindung in die S1'-Bindetasche konkurriert. Eine Erhöhung der Affinität zum peptidischen Nukleophil begünstigt somit die Deacylierung via Aminolyse.^[200,201]

Die Konstruktion der korrespondierenden DNA-Bibliothek wird detailliert im Kapitel 3.4.2 (S. 68) sowie Kapitel 4.1.2 (S. 90) beschrieben. Für eine Randomisierung der sechs Aminosäurepositionen wurden alle Aminosäuren bis auf Cystein zugelassen, sodass sich auf DNA- sowie Proteinebene eine Diversität von $4,7 \cdot 10^7$ einzigartigen Trypsinvarianten ergibt. Nach der sequentiellen Assemblierung der Leserahmen-selektierten konstanten sowie randomisierten Fragmente wurden zur Beurteilung der Bibliotheksqualität 143 einzelne Trypsiligase-Varianten sequenziert. Neben dem erfolgreichen Ausschluss von Cystein sowie einer Gleichverteilung eingebauter Aminosäuren an den randomisierten Aminosäurepositionen konnte die hervorragende Qualität der DNA-Bibliothek mit 95,8 % funktionalen Varianten auf DNA- und Proteinebene bestätigt werden. Zudem konnte an keiner der randomisierten Aminosäurepositionen ein Stop-Codon verzeichnet werden. Somit liegt der Anteil an *escape*-Mutanten in der naiven Bibliothek bei weniger als 5 %, was ein hervorragender Ausgangspunkt für die Unterdrückung von *escape*-Mutanten während der Selektion ist. Bei Einsatz der NNK-Methode zur Randomisierung von sechs Aminosäurepositionen würde allein der Anteil an *escape*-Mutanten mit einem Stop-Codon bei 18,75 % liegen. Hinzu kommt der Anteil an *escape*-Mutanten mit *frameshift*-Mutation, welcher bei fehlender Leserahmenselektion beträchtlich sein kann. So lag die Funktionalität einer NNK-basierten Bibliothek mit sechs randomisierten Aminosäurepositionen auf Basis von Ubiquitin^[202] bei 68 % und auf Basis des artifizialen Proteins M7^[203] bei 49 %. Im Falle der auf Trypsiligase basierenden DNA-Bibliothek von Frau GISSEL lag die experimentell ermittelte Funktionalität bei ca. 20 %.^[159]

Für die Anreicherung verbesserter Trypsiligase-Varianten wurde eine Selektion mittels Phagen-Display durchgeführt, welche ausführlich in den Kapiteln 3.4.4 (S. 75) und 4.2 (S. 93) beschrieben wird. Für die Durchführung der Selektion wurde die Trypsiligase-basierte DNA-Bibliothek in den optimierten Phagemidvektor pMB-04 kloniert, welcher eine Anreicherung von *escape*-Mutanten während der Phagenpropagierung durch *E. coli*-Zellen unterdrückte. Es wurden zwei separate Selektionen (Selektion A und B) durchgeführt, welche sich hinsichtlich der Streptavidin-beschichteten magnetischen *beads* unterschieden, die für die Immobilisierung des biotinylierten Peptidsubstrates (Biotin-PEG-GAAYRHAAGEQKLISEEDL-OH) verwendet wurden. In Selektion A wurden M270-*beads* verwendet, welche über eine carboxylierte und damit negativ geladene Oberfläche verfügen. Für Selektion B wurden M280-*beads* verwendet, welche über eine tosylierte Oberfläche verfügen und damit einen hydrophoberen Charakter besitzen. Bei beiden Selektionen wurden jeweils vier Selektionsrunden durchgeführt, wobei der Selektionsdruck von Runde zu Runde gesteigert wurde. Ermöglicht wurde dies durch die sukzessive Reduzierung von Substratmenge und Nukleophilkonzentration, der Erhöhung von Anzahl und Dauer der Waschschrte sowie der Verringerung der Elutionszeit. Die ersten beiden Selektionsrunden wurden mit geringer Selektionsstringenz durchgeführt, um hierbei möglichst wenig potentiell verbesserte Biokatalysatoren zu verlieren. Die Selektionsrunden drei und vier wurden mit deutlich erhöhter Stringenz durchgeführt. Neben einer weiteren Erhöhung der Anzahl an Waschschrten war hierbei die Reduzierung der Nukleophilkonzentration um den Faktor fünf ausschlaggebend. Hierdurch sollte die Anreicherung von Varianten begünstigt werden, welche eine gesteigerte Affinität zum Nukleophil aufweisen.

Die Erhöhung des Selektionsdrucks resultierte in einem verminderten Verhältnis der Phagenanzahlen von Elutionsfraktion zu Waschfraktion (vgl. Tab. 23, S. 94). Ein Grund hierfür könnte die Verringerung der Elutionszeit sein, welche von der ersten hin zur vierten Selektionsrunde von 30 Minuten auf 10 Minuten reduziert wurde. Eine mögliche weitere Erklärung ist, dass eluierte Trypsiligase-Varianten, welche eine verbesserte Affinität zum Substrat aufweisen, erneut an immobilisiertes Substrat binden. In diesem Fall hätten verbesserte Biokatalysatoren eine apparent höhere Verweilzeit auf der *bead*-Oberfläche. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass während der Abnahme des Überstandes noch als Acyl-Enzym-Phagenintermediat vorliegende Trypsiligase-Varianten immobilisiert sind. Dies würde zum Verlust der Enzymvarianten führen. Abhilfe könnte in Zukunft die Zugabe von in Lösung befindlichem Substrat bringen, welches als Kompetitor fungiert. Anstelle des immobilisierten Substrates binden eluierte Trypsiligase-präsentierende Phagen an das in Lösung befindliche

Substrat und können nachfolgend mit dem Überstand isoliert werden. Alternativ könnte auch ein Inhibitor eingesetzt werden, welcher den gleichen Effekt erzielen würde. Zur Abreicherung unspezifisch bindender Phagen wurde in Selektionsrunde vier eine Präselektion mit geblockten *beads* und ohne immobilisiertes Substrat durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Anzahl an Phagen in der Wasch- sowie Elutionfraktion durch die Präselektion deutlich reduziert wurde. Dieser Effekt war bei Selektion A ausgeprägter als bei Selektion B. Zur weiteren Optimierung der Selektion könnte eine entsprechende Präselektion bereits in früheren Selektionsrunden durchgeführt werden. Auch ein Wechsel zwischen M270- sowie M280 *beads* innerhalb einer Selektion könnte eine weitere Optimierung darstellen, da hierdurch vermieden wird, dass sich Varianten anreichern, welche bevorzugt an die Oberfläche der magnetischen *beads* binden.

Generell ergab sich für Selektion B im Vergleich zu Selektion A eine um Faktor 10-20 erhöhte Anzahl an Phagen sowohl in der Wasch- als auch Elutionsfraktion (vgl. Tab. 23, S. 94). Ein Grund hierfür könnte die Oberflächenbeschaffenheit der verwendeten Streptavidin-beschichteten magnetischen *beads* sein. Mit einem isoelektrischen Punkt von 4,0 besitzen M13-Phagen bei neutralem bis leicht basischem pH-Wert eine negativ geladene Oberfläche. Diese wird maßgeblich durch den *N*-terminalen Bereich des Haupthüllproteins pVIII bestimmt, welches mit 2700 Kopien den Hauptanteil der Phagenhüllproteine ausmacht und reich an Aminosäuren mit sauren Resten ist.^[204] Die negativ geladene Oberfläche der M270 *beads* könnte dementsprechend zu einer verminderten unspezifischen Wechselwirkung zwischen Phagen und *bead*-Oberfläche führen und wäre somit eine Erklärung für die verminderte Phagenanzahl in Selektion A. Dieser Aspekt könnte sich positiv auf die Anreicherung von verbesserten Biokatalysatoren auswirken.

Für die Identifizierung von Trypsiligase-Varianten mit gesteigerter Transamidierungsaktivität wurde eigens ein *ELISA*-basiertes Hochdurchsatz-Screening etabliert, welches in den Kapiteln 3.5 (S. 77) und 4.3.1 (S. 94) beschrieben wird. Insgesamt wurden jeweils 368 Einzelvarianten aus den Selektionen A und B hinsichtlich der gewünschten Katalyseeigenschaft durchgemustert. Hierbei konnten 16 potentiell verbesserte Biokatalysatoren identifiziert werden, welche im direkten Vergleich zur nativen Trypsiligase eine ähnliche oder auch gesteigerte Produktausbeute innerhalb der *ELISA*-basierten Progresskurven aufzeigten (vgl. Abb. 13, S. 97). Dabei stammen elf Varianten aus Selektion A und fünf Varianten aus Selektion B. Für alle im Screening identifizierten Varianten wurde eine primäre enzymatische Charakterisierung durchgeführt, welche sich aus einer Analyse ihrer individuellen Mutationen an den randomisierten Aminosäurepositionen sowie einer initialen Beurteilung der Syntheseeffizienz zusam-

mensetzte. Zur Analyse der individuellen Mutationen wurden die Gensequenzen der einzelnen Trypsiligase-Varianten sequenziert (vgl. Tab. 25, S. 102). Bei drei Varianten aus Selektion A konnten die Mutationen nicht analysiert werden, da es sich hierbei um *multicopy*-Varianten handelte, bei denen die Gensequenzen von mindestens zwei selektierten Trypsiligase-Varianten in das Genom von *P. pastoris* integriert wurden, was als Artefakt der Transformation von *P. pastoris* zu betrachten ist. Diese wurden von einer weiterführenden Charakterisierung ausgeschlossen. Die Sequenzen der verbliebenen Varianten konnten erfolgreich ausgewertet werden. Hierbei zeigten mehrere Varianten aus Selektion A identische Mutationen. Von den verbliebenen acht Trypsiligase-Varianten besaßen fünf Varianten die Mutationen des Biokatalysators 3A11 sowie zwei Varianten die Mutationen von 4H3. Die Varianten der Selektion B zeigten einzigartige Sequenzen, wobei die Mutationen einer Variante identisch mit der von Variante 3A11 aus Selektion A waren.

5.3 Primäre Charakterisierung potentiell verbesserter Biokatalysatoren

Bei näherer Betrachtung der individuellen Aminosäuren an den randomisierten Positionen aller Trypsiligase-Varianten können Sequenzmotive festgestellt werden, welche sich im Rahmen der Selektion angereichert haben. So besitzen alle Trypsiligase-Varianten eine aromatische Aminosäure in Position 99, welche bei der nativen Trypsiligase durch ein Leucin besetzt ist. In Position 97 ist bei allen Varianten aus Selektion A ein Tryptophan vorzufinden, während zwei von vier Varianten aus Selektion B in dieser Position ein Aspartat aufweisen. Dies ist ein markanter Unterschied zu Lysin mit positiv geladener Seitenkette, welches in Trypsiligase zu finden ist. In den Positionen 55 und 190 dominieren Aminosäuren mit kleinen Seitenketten, welche polarer oder unpolarer Natur sind. Für Position 55 ergibt sich diese Präferenz vermutlich aus der räumlichen Nähe zur Seitenkette von Histidin 57. Aminosäuren mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten haben vermutlich einen starken Einfluss auf die räumliche Ausrichtung dieses Histidins, welches wiederum Bestandteil der katalytischen Triade ist. Dies wiederum kann die Funktion der katalytischen Triade im Kontext der Enzymkatalyse stark negativ beeinflussen, da dem Histidin 57 während der kovalenten Katalyse eine wichtige Rolle für Protonentransferreaktionen im Acylierungs- und Deacylierungsschritt zukommt. Aminosäuren mit sterisch weniger anspruchsvollen Seitenketten erlauben hierbei vermutlich eher eine Modulation der Effektorfunktion des Histidins, ohne dabei gänzlich die Aktivität des Biokatalysators zu zerstören. Dies könnte für die gewünschte Transamidierungsaktivität von besonderer Bedeutung sein.

An Position 192 besitzen drei Varianten eine Aminosäure mit einer negativ geladenen Seitenkette (Glu oder Asp). Position 40, welche in Trypsiligase durch ein Histidin besetzt ist, wird durch die Aminosäuren Prolin und Asparagin dominiert.

Für eine initiale Charakterisierung hinsichtlich ihrer Syntheseeffizienz wurden die sieben Trypsiligase-Varianten mit korrekter DNA-Sequenz zunächst rekombinant in *P. pastoris* hergestellt und durch ein chromatographisches Zweischrittreinigungsverfahren zur Homogenität gereinigt. Hierbei konnten die Enzymvarianten mit einer variierenden Ausbeute zwischen 0,8 und 12,2 mg je Liter Kulturvolumen erhalten werden. Für die native Trypsiligase liegt die Ausbeute unter analogen Bedingungen bei 14,3 mg je Liter Kulturvolumen. Dabei zeigte sich die Tendenz, dass der Einbau eines hydrophoben Tryptophans an der Lösungsmittel-exponierten Position 97 zu verminderten Ausbeuten bei der Proteinbiosynthese führte, so zu beobachten bei den Varianten 2D8, 3A11 und 4H3. Generell gibt es viele Optionen, die Ausbeute der Proteinbiosynthese durch *P. pastoris* effizient zu steigern. So bietet sich zunächst eine Kultivierung im Fermenter an, wodurch deutlich höhere Zelldichten generiert werden können, was wiederum direkt mit der Ausbeute an rekombinant hergestelltem Protein korreliert. Auch die Möglichkeit zur Kontrolle und Anpassung von pH-Wert, Sauerstoffsättigung und Methanolkonzentration tragen maßgeblich zu einer gesteigerten Effizienz der Proteinbiosynthese durch *P. pastoris* bei.^[205,206] Die Möglichkeit zur Regulierung des pH-Wertes könnte für die rekombinante Herstellung der Trypsiligase-Varianten von besonderer Bedeutung sein, da im zweiten Reinigungsschritt via Größenausschlusschromatographie bei allen Varianten ein hoher Anteil an Aggregaten zu verzeichnen war (vgl. Anhang Abb. A10, S. 181). Grund hierfür könnte das stete Absinken des pH-Wertes im Kulturmedium während der Proteinbiosynthese sein, wobei der pH-Wert trotz Pufferung durch 50 mM MES von pH 6 auf pH 3,5 sank. Dadurch lag der pH-Wert des Kulturmediums temporär im Bereich des isoelektrischen Punktes der Trypsiligase-Varianten (dieser liegt bei einem pH von 4,5-5), was letztlich zur partiellen Aggregation führen kann. Eine konstante Pufferung des Kulturmediums mit einem pH-Wert ober- oder unterhalb des isoelektrischen Punktes könnte zur Reduzierung der Aggregate und somit zur Steigerung der Proteinausbeute beitragen. Weitere mögliche Optimierungsschritte sind die Anpassung der *codon usage* sowie die Selektion von *P. pastoris*-Kolonien, bei denen das Gen des rekombinanten Proteins mehrfach ins Genom integriert wurde.^[207]

Für die gereinigten Trypsiligase-Varianten erfolgte anschließend eine initiale Charakterisierung hinsichtlich ihrer Syntheseeffizienz, wofür Transamidierungsstudien mit Modellpeptiden durchgeführt wurden (vgl. 4.4.3, S. 101). Die Peptidsequenzen von Acyldonor

(Bz-AAYRHAAG-OH) und Acylakzeptor (H-RHAAGEQKLISEEDL-OH) korrelierten hierbei mit den in der Selektion sowie im Screening verwendeten Modellpeptiden. Alle identifizierten Trypsiligase-Varianten zeigten ausnahmslos eine verbesserte Syntheseeffizienz, wobei die Produktausbeute unter gegebenen Reaktionsbedingungen um den Faktor 1,1 bis 1,5 gesteigert werden konnte. Dies Ergebnis unterstreicht das effiziente Zusammenspiel zwischen der qualitativ hochwertigen DNA-Bibliothek, dem optimierten Selektionsverfahren mittels Phagen-Display sowie dem etablierten Hochdurchsatz-Screening. Insbesondere Trypsiligase-Variante 2G10 zeigte im Vergleich zur nativen Trypsiligase mit einem Faktor von 1,5 die deutlichste Verbesserung bei der Produktausbeute. Maßgeblich hierfür ist der stark verbesserte Quotient aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit, welcher für Trypsiligase unter gegebenen Reaktionsbedingungen bei 4,7 lag und für Trypsiligase-Variante 2G10 auf 47,7 gesteigert wurde.

5.4 Enzymkinetische Charakterisierung der Trypsiligase-Variante 2G10

Ausgehend von dem Ergebnis einer deutlich verbesserten Syntheseeffizienz wurde Trypsiligase-Variante 2G10 im Hinblick auf eine praxisorientierte Verwendung zur Modifizierung therapeutisch relevanter Proteine hinsichtlich ihrer enzymkinetischen Eigenschaften charakterisiert (vgl. 4.5, S. 102). Dies umfasste Untersuchungen zur pH- und Temperaturabhängigkeit sowie eine detaillierte Betrachtung der enzymkatalysierten Transamidierungsreaktion. Hierdurch konnten auch erste Informationen zur Fragestellung gewonnen werden, welche Faktoren zur Steigerung der Syntheseeffizienz beitragen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Trypsiligase-Variante 2G10, ebenso wie die native Trypsiligase, eine hohe Spezifität für die Erkennungssequenz YRH besitzt, wobei insbesondere eine Substitution des Histidins in P2'-Position eine drastische Verminderung der Katalysegeschwindigkeit zur Folge hat (vgl. 4.5.1, S 102). Maßgeblich hierfür sind die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat, wofür in der S2'-Bindetasche von Trypsiligase die beiden artifiziell eingeführten Histidine N143H und E151H von entscheidender Bedeutung sind. Über die Imidazolringe dieser beiden Histidine wird der Imidazolring des Substrates in P2'-Position durch ein zweiwertiges Metallion als Zentralatom komplexiert. Bestätigt wurde dieser Befund letztlich auch durch die hohe Abhängigkeit der initialen Aminolysegeschwindigkeit von der Anwesenheit von Zinkionen, wie sie für Trypsiligase-Variante 2G10 gezeigt werden konnte (vgl. 4.5.4, S 109). Bei dem verwendeten Reaktionssetup (80 μ M Substrat, 400 μ M Nukleophil) ergab sich für die Zinkionen ein optimaler Konzentrationsbereich

zwischen 50-100 μM . In Abwesenheit von Zinkionen nahm die initiale Aminolysegeschwindigkeit dagegen um den Faktor 50 ab. Interessanterweise unterliegt die initiale Geschwindigkeit der konkurrierenden Hydrolysereaktion einer geringeren Zinkionen-Abhängigkeit. Hier lag der Unterschied lediglich bei Faktor 2. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Hydrolysereaktion lediglich im Acylierungsschritt von Zinkionen abhängig ist, nämlich bei der Substrateinbindung. Hierbei wird das P2'-Histidin des Substrates wie zuvor beschrieben über ein Zinkion mit den Histidinen der S2'-Bindetasche des Enzyms komplexiert. Die Einbindung des nukleophil angreifenden Wassermoleküls im Deacylierungsschritt ist hingegen unabhängig von der Anwesenheit von Zinkionen, sodass vermutlich nur die Verminderung der Acylierungsgeschwindigkeit einen Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit hat. Im Falle der Transamidierungsreaktion wird ein Zinkion sowohl im Acylierungs- als auch im Deacylierungsschritt benötigt. Konkret betrifft dies die Einbindung des Acyldonors im Acylierungsschritt (analog zur Hydrolysereaktion) sowie die Einbindung des peptidischen Nukleophils (Acylakzeptor) im Deacylierungsschritt. Letztlich trägt die Komplexierung des P2'-Histidins durch Zinkionen sowohl beim Substrat, als auch beim peptidischen Nukleophil maßgeblich zur Affinität bei.

Die Affinität des Enzyms für ein peptidisches Nukleophil hat wiederum einen entscheidenden Einfluss auf die Syntheseeffizienz des Biokatalysators, da das peptidische Nukleophil mit einem Wassermolekül im Deacylierungsschritt um eine Einbindung in die S1'-Bindetasche konkurriert. Daraus resultierend lässt sich postulieren, dass mit einer Erhöhung der Affinität des Enzyms für das peptidische Nukleophil die Wahrscheinlichkeit steigt, dass die Deacylierung via Aminolyse erfolgt. Dahingehend wurde die Affinität der Trypsiligase-Variante 2G10 für das peptidische Nukleophil H-RHAK-OH im Vergleich zur nativen Trypsiligase näher untersucht (vgl. 4.5.2, S 104). Hierzu wurden die apparenten Wechselzahlen für die Aminolyse- sowie Hydrolysereaktion bei einer konstanten Substratkonzentration von 80 μM und einer variierenden Nukleophilkonzentration zwischen 0-9600 μM bestimmt. Der Kurvenverlauf, der sich aus der graphischen Auftragung der ermittelten apparenten Wechselzahlen gegen die Nukleophilkonzentration ergab, entsprach dem Kurvenverlauf einer Substratüberschusshemmung. Die tatsächliche Ursache für die Substratüberschusshemmung, welche sowohl bei Trypsiligase als auch bei Trypsiligase-Variante 2G10 beobachtet wurde, ist derzeit nicht bekannt. Jedoch könnten zwei Aspekte eine Rolle spielen:

(i) Anhand der Kristallstruktur von Trypsiligase konnte gezeigt werden, dass bei Trypsiligase das Konformationsgleichgewicht zwischen Zymogen und aktivem Enzym in Richtung zymogener Konformation verschoben ist.^[129] Grund hierfür ist, dass die Aktivierungsdomäne

(diese umfasst die Aminosäuren I16-G19, G142-P152, L185-D194 und S217-N223) in Abwesenheit eines Substrates ungeordnet vorliegt und damit eine zymogenähnliche, inaktive Konformation einnimmt. Hierbei umfasst die Aktivierungsdomäne unter anderem die S1- sowie S2'-Bindetasche. Erst die Einbindung eines hochaffinen Substrates mit YRH-Erkennungssequenz drängt die Aktivierungsdomäne in eine aktive Konformation und ermöglicht damit den nachfolgenden Acylierungsschritt. Fraglich ist, ob das peptidische Nukleophil in die S'-Bindetaschen der Trypsiligase einbinden kann, wenn diese in einer zymogenähnlichen Konformation vorliegt. Sollte dem so sein, könnte es mit dem YRH-Substrat um eine Einbindung konkurrieren, was letztlich die Katalysegeschwindigkeit vermindern würde. Da eine steigende Nukleophilkonzentration die Aminolysegeschwindigkeit von Trypsiligase sowie der Trypsiligase-Variante 2G10 vermindert, könnte dies die Ursache sein.

(ii) Auch die limitierte Konzentration der Zinkionen könnte eine Rolle spielen. Denkbar wäre, dass in Lösung befindliche Zinkionen bei entsprechend hohem Überschuss an peptidischem Nukleophil durch die Histidine mehrerer Peptidnukleophile komplexiert werden, wodurch sie nicht mehr für die Substrateinbindung im Acylierungsschritt zur Verfügung stehen. Da die Geschwindigkeit des Acylierungsschrittes sowohl bei Trypsiligase, als auch bei Trypsiligase-Variante 2G10 jedoch stark von der Anwesenheit freier Zinkionen abhängt, könnte das Nukleophil-bedingte Wegfangen der Zinkionen vor allem bei hoher Nukleophilkonzentration ursächlich für den beobachteten Aktivitätsverlust sein.

Aus einer nichtlinearen Regression konnte bei Trypsiligase-Variante 2G10 für das Nukleophil ein K_m -Wert von 43,1 μM bestimmt werden. Gleichzeitig ergab sich für das Nukleophil ein K_i -Wert von 2395 μM . Damit einher geht für die Aminolyse eine apparente Katalysekonstante von 0,049 s^{-1} , welche ohne Substratüberschusshemmung 0,062 s^{-1} betragen würde. Im Falle der nativen Trypsiligase lag der K_m -Wert für das peptidische Nukleophil bei 193,7 μM und damit um den Faktor 4,5 höher als bei Trypsiligase-Variante 2G10. Auch die Nukleophilkonzentration, bei der die halbe Maximalgeschwindigkeit der Hydrolysereaktion erreicht wird, liegt mit 25,5 μM bei Trypsiligase-Variante 2G10 um den Faktor 5 niedriger, als bei Trypsiligase mit 137,5 μM . Dies korreliert mit der oben getroffenen Annahme, dass durch eine Erhöhung der Affinität zum peptidischem Nukleophil die Transamidierungsaktivität des Biokatalysators insbesondere bei niedrigen Substrat- und Nukleophilkonzentrationen verbessert wird.

Eine Erklärung hierfür ist, dass der K_m -Wert des Nukleophils jener Nukleophilkonzentration entspricht, bei der die Hälfte der aktiven Zentren aller Acyl-Enzym-Intermediate ein peptidisches Nukleophil eingebunden hat. Wird für die Transamidierungsreaktion eine Nukleophil-

konzentration eingesetzt, welche im Bereich des K_m -Wertes oder darunter liegt, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Wassermolekül als Nukleophil in die S1'-Bindetasche einbinden kann, was letztlich aufgrund der hohen Konzentration an Wassermolekülen (ca. 55 M) zur Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates führt. Diese Überlegung wird durch die Betrachtung des Quotienten aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit bei unterschiedlichen Nukleophilkonzentrationen für Trypsiligase-Variante 2G10 und Trypsiligase bestätigt. So liegt bei Trypsiligase-Variante 2G10 dieser Quotient bei einer Nukleophilkonzentration von 400 μM (entspricht ca. $10 \times K_m$) bei ca. 30 und damit sehr deutlich auf Seiten der Transamidierungsreaktion. Bei einer Nukleophilkonzentration von 40 μM (entspricht ungefähr K_m) sinkt der Quotient auf 2, was letztlich die Ausbeute an Transamidierungsprodukt stark mindert. Ähnlich verhält sich dies bei der nativen Trypsiligase. Bei einer Nukleophilkonzentration von 2400 μM (entspricht ca. $12 \times K_m$) liegt der Quotient bei ca. 10 und sinkt auf ca. 2 bei einer Nukleophilkonzentration von 240 μM (entspricht ungefähr K_m).

Letztlich spiegelt sich diese Abhängigkeit auch in dem Syntheseprofil, welches für die native Trypsiligase und Trypsiligase-Variante 2G10 erstellt wurde, wieder (vgl. 4.5.5, S. 112). Grundgedanke bei der Erstellung der Syntheseprofile war es, die Syntheseeffizienz unterschiedlicher Trypsiligase-Varianten bei variierenden Substrat- und Nukleophilkonzentrationen vergleichend darzustellen. So wurden für Trypsiligase-Variante 2G10 und Trypsiligase Transamidierungsreaktionen bei hoher und niedriger Substratkonzentration (250 μM und 15 μM) in Anwesenheit von 2, 5, 10 und 20 molaren Äquivalenten Nukleophil durchgeführt. Zur visuellen Darstellung wurden schließlich die maximalen Ausbeuten an Transamidierungsprodukt gegen die Äquivalente an Nukleophil bei hoher und niedriger Substratkonzentration aufgetragen. Die theoretisch maximal erreichbare Ausbeute an Transamidierungsprodukt, welche erzielt werden könnte, wenn keine Hydrolysereaktion stattfindet, hängt vom stöchiometrischen Verhältnis des extern hinzugegebenem Nukleophils zur Abgangsgruppe (welche im Acylierungsschritt vom Substrat abgespalten wird) ab. Grund hierfür ist, dass die Abgangsgruppe des Substrates ebenfalls im Deacylierungsschritt als Nukleophil agieren kann, sodass es zur erneuten Bildung des Ausgangssubstrates kommt. Sowohl Abgangsgruppe als auch Nukleophil verfügen über identische Aminosäuren im P1'-P4'-Bereich womit die Wechselwirkungen mit dem S1'-S4'-Bereich des Acyl-Enzym-Intermediates beim Deacylierungsschritt identisch sind und damit sehr wahrscheinlich auch deren Affinitäten. Unter der Annahme, dass die Gleichgewichtskonstante damit 1 ist, korreliert die maximale Produktausbeute im thermodynamischen Gleichgewicht mit dem Verhältnis von Nukleophil zu Abgangsgruppe. Bei vorhandener Hydrolyseaktivität wird die theoretisch maximale Produktaus-

beute jedoch vermindert, da das Hydrolyseprodukt nicht mehr als Acyldonor fungieren kann und somit dem Transamidierungsgleichgewicht entzogen wird. Wie bereits erwähnt, sind vor allem bei niedrigen Substrat- und Nukleophilkonzentrationen im Kontext der konkurrierenden Einbindung zwischen Wassermolekül und peptidischem Nukleophil, Trypsiligase-Varianten mit hoher Affinität hinsichtlich der Ausbeute an Transamidierungsprodukt begünstigt. So finden sich die beiden Abhängigkeiten für die Transamidierungsausbeute im Syntheseprofil wieder:

- (i) die Zunahme der maximalen Produktausbeute mit Zunahme der Äquivalente an Nukleophil, was wiederum durch ein steigendes Verhältnis von Nukleophil zu Abgangsgruppe bedingt wird, und
- (ii) die Abnahme der Produktausbeute bei Verminderung der Substrat- und damit einhergehend auch der Nukleophilkonzentration (da das Nukleophil als Vielfaches molares Äquivalent eingesetzt wird), was wiederum ein Effekt der Konkurrenz zwischen Wasser und peptidischem Nukleophil darstellt.

Letztlich zeigt Trypsiligase-Variante 2G10 im Vergleich zur nativen Trypsiligase bei allen Substrat-Nukleophil-Kombinationen eine deutlich verbesserte Syntheseeffizienz. Bei einer Substratkonzentration von 250 μM und 2 molaren Äquivalenten Nukleophil liegt die theoretisch erreichbare Produktausbeute bei 66,7 %. Trypsiligase-Variante 2G10 erzielt unter diesen Bedingungen eine maximale Ausbeute von ca. 59 %. Zum Zeitpunkt der maximalen Produktausbeute liegen zudem ca. 8 % Hydrolyseprodukt vor, was wiederum mit der Differenz zwischen theoretisch erreichbarer und praktisch erhaltener Produktausbeute (entspricht 7,7 %) korreliert. Der Quotient aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit liegt bei 26, womit die Aminolyse stark gegenüber der Hydrolyse favorisiert wird. Trypsiligase erreicht unter diesen Bedingungen im Maximum ca. 42 % Transamidierungsprodukt und ca. 26 % Hydrolyseprodukt. Diese verminderte Produktausbeute geht mit einem verringerten Quotienten aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit von 4 einher. Korreliert man die eingesetzte Nukleophilkonzentration von 500 μM mit den K_m -Werten der Enzymvarianten für das Nukleophil, so liegt die verwendete Nukleophilkonzentration bei ca. $10,9 \times K_m$ für Trypsiligase-Variante 2G10 und $2,6 \times K_m$ für Trypsiligase. Bei einer Substratkonzentration von 15 μM und ebenfalls 2 molaren Äquivalenten Nukleophil entspricht die Nukleophilkonzentration mit 30 μM ca. $0,7 \times K_m$ für Trypsiligase-Variante 2G10 und $0,15 \times K_m$ für Trypsiligase. Dies wiederum bedingt eine deutlich verminderte Produktausbeute für Trypsiligase, welche bei ca. 11 % liegt. Bei Trypsiligase-Variante 2G10 fällt die Verminderung der Produktausbeute auf ca. 39 %

deutlich moderater aus, was als Effekt der besseren Affinität zum Nukleophil gewertet werden kann.

Dieser Befund korreliert mit sehr gut mit den umfangreichen Studien, welche von SCHELLENBERGER *et al.* hinsichtlich der kinetisch kontrollierten Protease-katalysierten Synthesestrategie angefertigt wurden.^[146,208,209] Hierbei konnte in zahlreichen Acyltransfer-Experimenten gezeigt werden, dass die Fähigkeit von verschiedenen Serinproteasen (Chymotrypsin aus Ratte, Trypsin aus Ratte, α -lytische Protease) zur Übertragung eines Acylrest auf einen peptidischen Acylakzeptor stark von der Spezifität und damit Affinität der Protease für den Acylakzeptor abhängt. Dazu wurden schwach aktivierte Esterderivate von Aminosäuren oder Peptiden mit passender P1-Spezifität eingesetzt, welche eine schnelle Bildung des Acyl-Enzym-Intermediates bedingen, sowie peptidische Nukleophile mit variierenden Aminosäuren in P1'-P3'-Position. Letztlich konnte gezeigt werden, dass die Effizienz des Acyltransfers mit der Erhöhung der Spezifität für den Acylakzeptor korrelierte.^[146,208,209]

Auch die thermodynamischen Parameter, welche im Rahmen der Studien zur Temperaturabhängigkeit der Transamidierungsreaktion für Trypsin-Variante 2G10 ermittelt wurden, bekräftigen die Annahme, dass eine erhöhte Affinität des Enzyms zum peptidischen Nukleophil die Transamidierungsreaktion begünstigt (vgl. 4.5.3, S. 107). Hierbei wurden die apparenten Wechselzahlen der konkurrierenden Aminolyse- und Hydrolysereaktion bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen, um anschließend über eine Analyse nach EYRING die thermodynamischen Parameter für die Ausbildung des aktivierten Komplexes bestimmen zu können. Demzufolge ist die Deacylierung via Aminolyse durch eine geringere freie Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger gegenüber der konkurrierenden Hydrolyse favorisiert. Maßgeblich hierfür ist eine Zunahme der Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger im Fall der Aminolyse, währenddessen der entropische Beitrag bei der Hydrolysereaktion eine untergeordnete Rolle spielt. Die Aktivierungsenthalpie ΔH^\ddagger ist für die Aminolyse- und Hydrolysereaktion nahezu identisch. Somit lässt sich für Trypsin-Variante 2G10 schlussfolgern, dass im Deacylierungsschritt die Aminolyse gegenüber der Hydrolyse entropisch begünstigt ist. Auf molekularer Ebene ist eine Entropiezunahme bei Ausbildung des Übergangszustandes mit einer Erhöhung der Mikroheterogenität als Folge der gesteigerten Anzahl an Mikrozuständen assoziiert.^[210,211] Eine Erklärung ist, dass die Einbindung des peptidischen Nukleophils sterisch deutlich anspruchsvoller ist als bei einem Wassermolekül. Dabei versteht sich der Komplex aus Acyl-Enzym-Intermediat und peptidischem Nukleophil bzw. Acyl-Enzym-Intermediat und nukleophil angreifendem Wassermolekül als Makrozustand. Im Vergleich zum Wassermolekül geht die Einbindung des peptidischen Nukleophils mit einer größeren

Anzahl nicht kovalenter Wechselwirkungen einher, was wiederum eine erhöhte Anzahl an Mikrozuständen bedingt. Da die Entropie ein Maß für die Anzahl von Mikrozuständen eines Makrozustandes ist, korreliert eine Zunahme der Mikrozustände mit einer Zunahme der Entropie. Zudem bewirkt die Einbindung des peptidischen Nucleophils eine Verdrängung von Wassermolekülen aus der geordneten Hydrathülle im Bereich der S'-Bindetaschen des Enzyms, was ebenfalls eine Entropiezunahme zur Folge hat.

Ein weiterer Effekt, welcher einen positiven Einfluss auf die Syntheseeffizienz von Trypsin-Variante 2G10 haben könnte, ist mit der Mutation des Alanins in Position 55 gegen ein Serin assoziiert. Wie zuvor beschrieben, befindet sich die Seitenkette von Alanin 55 in räumlicher Nähe zur Seitenkette von Histidin 57, welches Bestandteil der katalytischen Triade ist. Ein Aminosäureaustausch könnte aufgrund dieser räumlichen Nähe die Ausrichtung des Histidins beeinflussen, was wiederum Auswirkungen auf die Effektorfunktionen des Histidins im Kontext der katalytischen Triade haben könnte. Dieses agiert bei der kovalenten Katalyse als Base und als Säure im Rahmen von Protonentransferreaktionen im Acylierungs- und Deacylierungsschritt. Insbesondere im Deacylierungsschritt könnte eine verminderte Basenaktivität des Imidazolrings von Histidin die Transamidierungsreaktion begünstigen. Grund hierfür ist, dass der pKs-Wert der α -Aminogruppe des peptidischen Nucleophils mit ca. 9 (variiert in Abhängigkeit von der Aminosäure sowie den benachbarten Aminosäuren^[212]) deutlich geringer ist als der pKs-Wert eines Wassermoleküls mit 15,7. Im Vergleich zur α -Aminogruppe muss das Wassermolekül somit stärker aktiviert werden, um als Nucleophil im Deacylierungsschritt agieren zu können, was wiederum durch Histidin 57 der katalytischen Triade realisiert wird. Das N ϵ 2-Stickstoffatom des Imidazolrings von Histidin 57 fungiert hierbei als generelle Base, welche zunächst eine Wasserstoffbrücke zum Wassermolekül, insofern die räumliche Nähe gegeben ist, ausbildet. Dies führt beim Wassermolekül zur Polarisierung einer Wasserstoff-Sauerstoff-Bindung, wodurch dessen pKs-Wert erniedrigt wird und die Nucleophilie des Sauerstoffs steigt.^[195] Kann Histidin seiner Funktion als Base aufgrund einer veränderten räumlichen Ausrichtung nur bedingt nachkommen, führt dies zu einer verminderten Aktivierung des Wassermoleküls, womit dessen pKs-Wert nicht erniedrigt wird. Dies vermindert letztlich die Geschwindigkeit der Deacylierung via Hydrolyse. Hinzu kommt, dass auch die Acylierungsgeschwindigkeit und damit die Gesamtgeschwindigkeit der Enzymkatalyse mit der Beeinträchtigung von Histidin 57 verringert wird. Grund hierfür ist, dass im Acylierungsschritt die Nucleophilie der β -Hydroxylgruppe von Serin 195 ebenfalls durch dieses Histidin als Base erhöht wird, welche schließlich das Carbonyl-C-Atom der zu spaltenden Peptidbindung angreift.

Solch eine Modulation der Hydrolyseaktivität durch eine Punktmutation an Position 55 konnte beispielsweise bei der Serinprotease Plasmin gefunden werden. Hier führt die Mutation A55T zu einer verminderten Hydrolyseaktivität von Plasmin. Solch eine A55T-Mutation im Plasmin konnte als Ursache bei Patienten mit venöser Thrombose oder mit Netz- und Aderhaut-Erkrankungen des Auges ausgemacht werden.^[197,198] Durch Moleküldynamik-Simulationen konnte für Plasmin A55T gezeigt werden, dass über die Hydroxylgruppe des Threonins 55 eine Wasserstoffbrücke zum N ϵ 2-Stickstoffatom des Imidazolringes von Histidin 57 ausgebildet wird. Über N ϵ 2 nimmt Histidin 57 in seiner Funktion als katalytische Base das Proton von Serin 195 im Acylierungsschritt oder das des Wassers im Deacylierungsschritt auf, wodurch deren pK_s-Werte erniedrigt werden. Die Interaktion von Threonin und Histidin bedingt jedoch eine Konformationsänderung von Histidin 57, wodurch die Positionierung des N ϵ 2 derart verändert wird, dass Histidin nur noch bedingt als katalytische Base agieren kann. Dies hat zur Folge, dass die Nukleophilie von Ser 195 sowie einem nukleophil angreifenden Wasser nur unzureichend erhöht wird, was wiederum die oben beschriebenen Effekte zur Folge hat.^[197,198]

Da Trypsiligase-Variante 2G10 ein Serin in Position 55 besitzt, könnten hier ähnliche Effekte wie bei Plasmin mit A55T-Mutation eine Rolle spielen. Weil die Seitenkette von Serin der von Threonin sehr ähnlich ist (Deletion der Methylgruppe in γ -Position), könnte auch hier eine Interaktion mit dem Histidin 57 vorliegen. Eigene Experimentelle Daten deuten auf einen solchen Einfluss hin. So konnte für Trypsiligase-Variante 2G10 bei den Hydrolysestudien zur Bestimmung der Enzymspezifität eine verringerte Gesamtaktivität für die Hydrolyse verschiedener Peptidsubstrate festgestellt werden, wobei der diesbezügliche k_{cat} -Wert von Trypsiligase-Variante 2G10 im Vergleich zu Trypsiligase um den Faktor 5 erniedrigt war. Zudem konnte in der Masterarbeit von Frau C. SCHMIDT (AG BORDUSA, MLU Halle-Wittenberg) gezeigt werden, dass eine Rückmutation des Serin 55 zu einem Alanin bei Trypsiligase-Variante 2G10 einen deutlichen Einfluss auf die Gesamtaktivität sowie auf den Quotient von Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit hat.^[213] Konkret konnte für Trypsiligase-Variante 2G10 bei einer Substratkonzentration von 100 μM mit einem zweifachen Überschuss an Nukleophil eine initiale Aminolysegeschwindigkeit von 0,043 s^{-1} bestimmt werden. Der Quotient aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit lag bei 23,7. Im Vergleich hierzu zeigte Trypsiligase-Variante 2G10 mit S55A-Mutation mit 0,193 s^{-1} eine um Faktor fünf gesteigerte Aminolysegeschwindigkeit, wobei der Quotient aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit mit 9,6 um den Faktor 2,5 verringert wurde. Somit ergibt sich eine starke Evidenz dafür, dass die gesteigerte Syntheseeffizienz der Trypsiligase-Variante 2G10 auf zwei Faktoren beruht:

- (i) durch eine verbesserten Affinität zum Nukleophil, welches mit einem Wassermolekül um eine Einbindung in die S1'-Bindetasche im Deacylierungsschritt konkurriert, und
- (ii) durch eine Modulation der Funktion des Histidins 57 (Bestandteil der katalytischen Triade) als katalytische Base, wodurch insbesondere die Aktivierung eines Wassermoleküls im Deacylierungsschritt verringert wird, was wiederum indirekt eine Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediates via Aminolyse begünstigt.

Die hohe Syntheseeffizienz sowie die ermittelten enzymkinetischen Parameter deuten darauf hin, dass Trypsiligase-Variante 2G10 ein beachtliches Potential als nützliches Werkzeug für die posttranslationale Modifikation von Proteinen und Peptiden besitzen könnte. Verdeutlicht wird dies am Beispiel der Sortase A aus *Staphylococcus aureus*, welche detailliert im Kapitel 1.2.2 (S. 14) beschrieben ist. So konnten mittels Sortase A eine Vielzahl unterschiedlichster Proteine sowohl in Lösung als auch immobilisiert oder gar auf Zelloberflächen befindlich modifiziert werden. Hierbei ähnelt der Reaktionsmechanismus (Transpeptidierung) dem von Trypsiligase-Variante 2G10. So spaltet Sortase A innerhalb der Erkennungssequenz LPXTG (X steht für jede beliebige Aminosäure) spezifisch die Peptidbindung zwischen Threonin und Glycin, wobei ein Acyl-Enzym-Intermediat mit dem Carbonyl-C-Atom des Threonins ausgebildet wird. Anschließend erfolgt die Deacylierung durch den nukleophilen Angriff einer N-terminalen α -Aminogruppe eines extern hinzugegebenen Pentaglycins. Wie bei Trypsiligase-Variante 2G10 kann auch Wasser als Nukleophil fungieren, jedoch wird das Pentaglycin als Nukleophil stark favorisiert. Hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit besitzt Trypsiligase-Variante 2G10 jedoch einen deutlichen Vorteil. Dies zeigt sich anhand der enzymkinetischen Parameter der Sortase A. So besitzt diese einen k_{cat} -Wert von $1,5 \text{ s}^{-1}$ für die Transpeptidierungsreaktion, wobei die K_{m} -Werte für das Substrat und das peptidische Nukleophil bei 7,6 mM und 140 μM liegen.^[98] Da die Modifizierung von Biomolekülen, wie beispielsweise die Verknüpfung von Antikörper und Toxin bei ADCs, bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen (typischerweise bis ca. 25-50 μM bei Antikörpern und 10-20 Äquivalente Nukleophil) durchgeführt werden, verläuft die Sortase A-katalysierte Reaktion sehr langsam und bedingt teilweise äquimolare oder sogar höhere Konzentrationen von Enzym gegenüber dem Acyldonor sowie lange Reaktionszeiten.^[95,214,215] Der Grund hierfür ist, dass sowohl Acyldonor (z. B. Antikörper), als auch Acylakzeptor (z. B. Nukleophil mit *payload*) nicht in Substratsättigung vorliegen und somit beiderseits zur Verringerung der Katalysegeschwindigkeit unter den gegebenen Reaktionsbedingungen beitragen.

Um dieser Limitation entgegenzuwirken, wurde ein hoher Aufwand in die Verbesserung der nativen Sortase A investiert. Hierzu wurden mittels evolutionärem Enzym-Engineering unter

Verwendung eines Hefe-Displays Varianten selektiert, welche eine verbesserte katalytische Effizienz besitzen.^[98] Im Vergleich zur nativen Sortase A verfügt die vielversprechendste Variante (5M genannt, besitzt die 5 Mutationen P94R/D160N/D165A/K190E/K196T) über einen gesteigerten k_{cat} -Wert von $5,4 \text{ s}^{-1}$ und zudem über einen verbesserten K_{m} -Wert für das Substrat von $0,23 \text{ mM}$ sowie über einen deutlich verschlechterten K_{m} -Wert für das peptidische Nukleophil von $2,9 \text{ mM}$. Diese Variante konnte erfolgreich für die Generierung von ADCs eingesetzt werden, wobei für die Modifizierung von Trastuzumab mit dem Spindeltoxin DM1 nur noch $0,062$ Äquivalente Biokatalysator eingesetzt werden mussten.^[97] Da das peptidische Nukleophil mit Wasser um die Deacylierung des Acyl-Enzym-Intermediates konkurriert, könnte sich der verschlechterte K_{m} -Wert von Sortase-Variante 5M negativ auf die Syntheseeffizienz auswirken. Zudem könnte sich die verminderte Affinität vom Enzym zum peptidischen Nukleophil auf die Selektivität gegenüber anderen Acyldonoren auswirken, so dass unspezifische Modifikationen von beispielsweise Lysinseitenketten möglich sind. Tatsächlich konnte bei der Pentamutante eine deutlich erhöhte Geschwindigkeit für die Hydrolyse der Erkennungssequenz LPETG sowie für unerwünschte Nebenreaktionen bei der Modifizierung von GFP als Modellprotein beobachtet werden.^[101] Hier konnte die Modifizierung einer Lysinseitenkette, welche zur Bildung von kovalenten GFP-Homodimeren führt, gezeigt werden. Dieser Effekt war bei Sortase 5M deutlich ausgeprägter als bei dem Wildtypenzym. Desweiteren wurde bei der Reaktion mittels 5M festgestellt, dass das GFP intramolekular zirkularisiert wird, vermutlich durch eine Transamidierungsreaktion, bei dem die Aminofunktion des *N*-Terminus von GFP als Acylakzeptor fungiert.^[101] Die Bildung einer Sortase-katalysierten Isopeptidbindung konnte ebenfalls für ein Fab-Fragment (L19) festgestellt werden, welches am *C*-Terminus der leichten Kette mit der Erkennungssequenz LPETG ausgestattet wurde.^[100] Neben der eigentlichen Transamidierungsreaktion katalysierte Sortase A die Bildung einer intramolekularen Isopeptidbindung mit der ϵ -Aminofunktion von Lys132 der schweren Kette des Fab-Fragmentes.

Basierend auf der Sortasevariante 5M konnten weitere Biokatalysatoren mit gesteigerter Enzymaktivität entwickelt werden.^[167] Die zusätzliche Einführung von bis zu drei weiteren Aminosäuremutationen (D124G/Y187L/E189R), welche im Rahmen eines Hochdurchsatz-Screenings identifiziert wurden, lieferte letztlich eine Sortase-Variante (5+ genannt), welche einen gesteigerten k_{cat} von 22 s^{-1} besitzt. Die K_{m} -Werte für das Substrat und das peptidische Nukleophil liegen bei $1,3 \text{ mM}$ und $1,7 \text{ mM}$. Diese Sortase-Variante konnte zudem durch zwei weitere Mutationen (E105K/E108Q) Calciumionen-unabhängig gemacht werden (7+ genannt).^[216] Da Variante 7+ auf der Variante 5M basiert, kann auch bei dieser Sortase-Variante

eine Tendenz zur unspezifischen Modifikation festgestellt werden. So lässt sich bei der Dualmodifikation eines scFv-Fragmentes, bei der die Sortase-katalysierte Modifizierung mit der π clamp-Technologie kombiniert wurde, ein beträchtlicher Anteil von unerwünschten Nebenprodukten nach dem Modifizierungsschritt mittels Sortase-Variante 7+ feststellen, welche in einer SDS-PAGE-Analyse ein deutlich größeres apparentes Molekulargewicht aufweisen.^[217] Dies lässt vermuten, dass auch hier eine interchenare Verknüpfung via Sortase A-katalysiert wird, welche im erwähnten Beispiel mittels Größenausschlusschromatographie abgetrennt werden muss.

Diese Beispiele zeigen, dass die Reaktionsbedingungen und Möglichkeiten der Sortase A-katalysierten Modifikation, insbesondere mit den verbesserten Varianten, unter Umständen auf das zu modifizierende Protein abgestimmt und individuell angepasst werden müssen.

5.5 Anwendungsorientierte Charakterisierung der Trypsiligase-Variante 2G10

Die anwendungsnahe Verwertbarkeit der Trypsiligase-Variante 2G10 für die Proteinmodifikation wurde im abschließenden Teil dieser Arbeit demonstriert (vgl. 4.6.2, S. 116). Da die Generierung therapeutischer Proteine, wie ortsspezifisch modifizierte Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs), von hohem Interesse ist, wurden zwei Antikörperderivate beispielhaft enzymkatalysiert modifiziert und anschließend hinsichtlich Homogenität und Bindungsfunktionalität untersucht. Hierbei wurden zwei Fab-Fragmente mit therapeutischer Relevanz verwendet. Dies war zum einen ein Her2/neu-spezifisches Fab-Fragment, welches vom therapeutisch zugelassenen Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®], Roche) abgeleitet wurde.^[218] Dieser wiederum ist die Antikörperkomponente der beiden ADCs Kadcyła[®] (Trastuzumab emtansin)^[211] und Enhertu[®] (Trastuzumab Deruxtecan)^[291], welche zur Behandlung von fortgeschrittenem Brustkrebs zugelassen sind. Zum anderen wurde ein TNF α -spezifisches Fab-Fragment gewählt, welches Bestandteil des Antikörper-Fragment-Konjugates Cimzia[®] (Certolizumab pegol) ist.^[12] Dieses wiederum ist für die Behandlung von rheumatoider Arthritis zugelassen.

Um zu untersuchen, inwiefern die Acyldonorkomponente (Fab-Fragment mit C-terminaler Erkennungssequenz) die Transamidierungsreaktion beeinflusst, sollten beide Fab-Fragmente mit demselben Nukleophil modifiziert werden. Hierbei handelte es sich um H-RHAK(CF)-OH, welches mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5(6)-Carboxyfluorescein ausgestattet ist und eine sensitive Reaktionsanalytik ermöglicht. Anschließend wurde der Einfluss unterschiedlicher

Funktionalitäten, welche über das Nukleophil enzymkatalysiert angefügt werden, untersucht. Hierbei wurde das Her2/neu-spezifische Fab-Fragment mit einem weiteren Nukleophil, welches mit dem Toxin Maytansin (DM1) ausgestattet war, modifiziert. Die Kombination aus einem Her2/neu-spezifischen Antikörper und dem hydrophoben Spindeltoxin DM1 findet sich ebenfalls bei Kadcyła[®] wieder. Das TNF α -spezifische Fab-Fragment wurde wiederum mit einer sterisch anspruchsvollen Funktionalität modifiziert, einem Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht von 20 kDa. Diese Kombination findet sich in Cimzia[®] wieder.

Bei beiden Fab-Fragmenten wurde die Erkennungssequenz der Trypsilignase-Variante 2G10 am C-Terminus der schweren Kette angefügt (-DKTHYRH-cMyc, Erkennungssequenz ist unterstrichen), eine Region, welche im Vollängenantikörper der *hinge*-Region zuzuordnen ist. Hierbei konnte in einer initialen Modifizierungsstudie mit dem Her2/neu-spezifischen Fab-Fragment Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc festgestellt werden, dass die Transamidierungsreaktion mit dem Carboxyfluorescein-tragenden Nukleophil hinsichtlich Reaktionsgeschwindigkeit sowie Produktausbeute deutlich von der Transamidierungsreaktion mit Modellpeptiden abwich (vgl. Abb. 22, S. 117). Im Vergleich zur Transamidierung mit Modellpeptid konnte für das Fab-Fragment eine um den Faktor 50 verminderte Aminolysegeschwindigkeit verzeichnet werden. Gleichzeitig verringerte sich der Quotient aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit von über 30 beim Modellpeptid auf ca. 3,3 beim Fab-Fragment, was wiederum der Grund für die verminderte Produktausbeute im Fall des Fab-Fragmentes ist. Da sich Modellpeptid und Fab-Fragment im Wesentlichen in P2- und P3-Position voneinander unterscheiden, wurde der Einfluss der im Fab-Fragment befindlichen Aminosäuren (Threonin in P3-Position und Histidin in P2-Position) untersucht.

Hierzu wurden vergleichende Transamidierungsreaktionen mit Modellpeptiden durchgeführt, bei welchen das Threonin und Histidin in P2 und P3-Position schrittweise durch Alanin substituiert wurde. Das Peptid Bz-AAYRHAAG-OH entspricht der Aminosäuresequenz, welche in den Modellsubstraten der Selektion und des Hochdurchsatz-Screenings verwendet wurden. Auch die Insertion von Alanin zwischen Histidin und dem Tyrosin der Erkennungssequenz wurde untersucht. Tatsächlich zeigte sich für Bz-THYRHAAG-OH im Vergleich zum Peptid Bz-AAYRHAAG-OH eine um den Faktor 20 verminderte Aminolysegeschwindigkeit sowie ein stark verringerter Quotient aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit von 4,7. Eine Substitution des Histidins an P2-Position zu Alanin begünstigt deutlich die Reaktionsgeschwindigkeit. Im Vergleich zum Peptid Bz-THYRHAAG-OH steigt die Aminolysegeschwindigkeit des Peptides Bz-TAYRHAAG-OH um den Faktor 44. Auch der Quotient aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit steigt um den Faktor 5,5 auf 26,1. Lediglich der

Acyldonor Bz-AAYRHAAG-OH liefert mit 32,5 einen noch höheren Wert für diesen Quotienten. Auch die Insertion eines Alanins zwischen Histidin und Tyrosin führt zu einer deutlich verbesserten Reaktionskinetik sowie zu einem verbesserten Quotienten aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit von 18,1. Somit ist dies ein Hinweis dafür, dass Aminosäuren mit sterisch anspruchsvolleren Seitenketten in P2-Position des Acyldonors einen negativen Einfluss auf die Transamidierungsaktivität der Trypsiligase-Variante 2G10 haben.

Es konnte in der Masterarbeit von Frau C. SCHMIDT (AG BORDUSA, MLU Halle-Wittenberg) gezeigt werden, dass die native Trypsiligase eine derartige sterische Limitation in P2-Position nicht aufweist.^[213] Als ursächlich hierfür hat sich hauptsächlich die Aminosäureposition 99 erwiesen, welche im Rahmen des evolutionären Enzym-Engineerings von Leucin zu Phenylalanin in der Trypsiligase-Variante 2G10 mutiert wurde. Interessanterweise findet sich die Mutation L99F bei vier von sieben identifizierten Trypsiligase-Varianten (2G10, 4E10, 3A11 und 1B8, vgl. Tab. 25, S. 102). Zudem besitzen die drei anderen Trypsiligase-Varianten (4B5, 2D8 und 4H3) ebenfalls eine aromatische Aminosäure (L99Y oder L99W) in dieser Position. Position 99 befindet sich im Bereich der S2-Bindungstasche, womit die Seitenkette in räumlicher Nähe zur P2-Aminosäure des Acyldonors liegt. Gemeinsam mit His57 und Trp215 bildet das native Leu99 eine hydrophobe Tasche, welche einen Einfluss auf die schwach ausgeprägte S2-Spezifität von Serinproteasen hat.^[195] So lässt sich die P4-P2 Spezifität von Trypsin durch Variation der Aminosäuren innerhalb der „99er“-loops (Aminosäureposition 96-99) anpassen.

Dies konnte beispielhaft für Trypsin gezeigt werden, indem die Aminosäuren des „99er“-loops von Enterokinase auf Trypsin übertragen wurden. Hierdurch konnte die Spezifität von Enterokinase für die Erkennungssequenz DDDDK (P5-P1) partiell auf Trypsin transformiert werden.^[219] Diese als EK-Trypsin bezeichnete Enzymvariante besitzt eine hohe Autokatalyseaktivität und vermag sich selbst durch Abspaltung des Propeptides nach der Erkennungssequenz DDDDK zu aktivieren. Zudem katalysiert es im Gegensatz zum Wildtyp-trypsin die Spaltung DDDDK-haltiger Peptidsubstrate und sogar von Proteinen mit rekombinant eingeführter DDDDK-Erkennungssequenz (z. B. DDDDK-RNaseA). Jedoch verfügt EK-Trypsin auch noch über eine Wildtypaktivität, so dass beispielsweise DDDDK-RNaseA auch außerhalb der DDDDK-Erkennungssequenz proteolytisch degradiert wird.

Die Präferenz für kleine Aminosäuren in P2-Position zeigt sich ebenfalls bei Matriptase, welche zur Familie der Typ II transmembranen Serinproteasen (TTSPs) gehört und über eine C-terminal lokalisierte katalytische Domäne mit Chymotrypsin-ähnlicher Struktur verfügt.^[220] Wie die Trypsiligase-Variante 2G10 besitzt Matriptase in der katalytischen Domäne ein Phe-

nylalanin an Position 99 (gemäß Chymotrypsin-Nomenklatur^[221]). Durch Selektivitätsstudien mit Ketobenzothiazol-basierten Inhibitoren, bei welchen die Aminosäuren in P1- und P2-Position variiert wurden, konnte festgestellt werden, dass Matriptase Aminosäuren mit kleinen oder fehlenden Seitenketten (Alanin und Glycin) in P2-Position favorisiert.^[222] Als Ursache hierfür konnte das Phenylalanin an Position 99 durch *docking*-Experimente identifiziert werden, welches sich in der S2-Bindetasche befindet. An dieser Position erschwert die sterisch anspruchsvolle Seitenkette des Phenylalanins die Einbindung von P2-Aminosäuren mit ebenfalls sterisch anspruchsvoller Seitenkette. Zudem könnten hydrophobe Interaktionen zwischen Phe99 und dem α -C-Atom eines Glycins in P2-Position die Einbindung des Inhibitors begünstigen. Diese Möglichkeit zur Variation der S2-Spezifität ist letztlich die Erklärung für die beobachtete sterische Limitation in P2-Position bei Trypsiligase-Variante 2G10.

So konnte ebenfalls in der Masterarbeit von Frau SCHMIDT gezeigt werden, dass eine Rückmutation des Phenylalanin 99 in der Trypsiligase-Variante 2G10 zum nativen Leucin die Akzeptanz für Acyldonoren mit sterisch anspruchsvolleren Seitenketten in P2-Position verbessert.^[213] Jedoch führt diese Rückmutation auch zu einer verminderten Syntheseeffizienz. Ein Grund hierfür könnte eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen Phe99 der Trypsiligase-Variante 2G10 mit dem in P2-Position befindlichen Alanin des Acyldonors sein. Wie eingangs erwähnt, könnte sich eine solche Wechselwirkung des Enzyms mit dem P-Bereich des Acyldonors begünstigend auf die Enzymkatalyse auswirken, da hierdurch die Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes, die Desolvatation von Enzym und Substrat, die Fixierung des Substrates in der, für die Katalyse wichtigen kanonischen Konformation, die korrekte Ausrichtung der zu spaltenden Peptidbindung zum Serin 195 der katalytischen Triade und dem Oxianionenloch oder auch die Stabilisierung von Konformationsänderungen während der Ausbildung von Übergangszuständen beeinflusst werden kann. Da sich die Mutation der Position 99 zu Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten bei allen selektierten Trypsiligase-Varianten wieder findet, ist davon auszugehen, dass diese Anreicherung während der Selektion mittels Phagen-Display stattgefunden hat. Als Acyldonorkomponente wurde hierbei Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH eingesetzt, welches über ein Alanin in P2-Position verfügt. Falls Biokatalysatoren mit Spezifitäten für bestimmte Aminosäuren in P2-Position erwünscht sind, könnte dies auf Seiten des Substrates im Rahmen der Selektion durch Anpassung der Substratsequenz sowie durch Randomisierung der Position 99 erzielt werden.

Letztlich wurde das Ergebnis der Transamidierungsstudie, nämlich das die Trypsiligase-Variante 2G10 ein Alanin in P2- und P3-Position des Acyldonors bevorzugt, auf die zu modifizierenden Fab-Fragmente übertragen. Hierzu wurden innerhalb der C-terminalen Sequenz

der schweren Kette (-DKTHYRH-cMyc) das Histidin zu Alanin substituiert sowie ein weiteres Alanin insertiert, so dass hieraus für das Her2/neu- sowie TNF α -spezifische Fab-Fragment die C-terminale Sequenz -DKTAAAYRH-cMyc resultierte (Anti-Her2-Fab-TAAAYRH-cMyc sowie Anti-TNF α -Fab-TAAAYRH-cMyc). Schließlich führte diese Sequenzanpassung zum gewünschten Ziel, nämlich einer deutlich verbesserten Reaktionskinetik sowie einer Steigerung der Produktausbeute. So konnte beim Anti-Her2-Fab-TAAAYRH-cMyc bei zehnfachem Überschuss an H-RHAK(CF)-OH die Ausbeute an Transamidierungsprodukt im Vergleich zu Anti-Her2-Fab-THYRH-cMyc von 55,0 auf 76,5 % erhöht werden. Ursächlich hierfür war ein deutlich verbesserter Quotient aus Aminolyse- zu Hydrolysegeschwindigkeit, welcher um den Faktor 8 von 3,3 auf 26,4 erhöht werden konnte. Zudem konnte auch die Aminolysegeschwindigkeit um den Faktor 7 gesteigert werden, was letztlich die benötigte Konzentration an Katalysator im Reaktionsansatz minimiert.

Weiterführend lässt sich feststellen, dass sich die mit den Fab-Fragmenten erzielten Produktausbeuten, welche bei zwei-, fünf- und zehnfachem Überschuss an Nukleophil erreicht werden, innerhalb des mit Modellpeptiden erstellten Syntheseprofils liegen. Analysen mittels SDS-PAGE sowie Massenspektrometrie zeigen zudem auf, dass die enzymkatalysierte Modifikation ortsspezifisch erfolgt (vgl. Abb. 23, S. 120 und Abb. 24, S. 121). So lässt sich im Massenspektrum neben dem Massenpeak des Eduktes (Anti-Her2-Fab-TAAAYRH-cMyc) lediglich der Massenpeak des Hydrolyseproduktes (Anti-Her2-Fab-TAAAY-OH) sowie des Transamidierungsproduktes (Anti-Her2-Fab-TAAAY-CF) beobachten. Nicht beobachtet werden konnten Fab-Spezies, welche mit mehr als einem Carboxyfluorescein beladen sind oder abweichende Molekulargewichte aufweisen. Dies wäre ein Hinweis auf eine unspezifische Modifikation gewesen. Zudem konnten keine unerwünschten Spaltprodukte detektiert werden. Auch bei der SDS-PAGE-Analyse zeigte sich mittels Fluoreszenzdetektion lediglich eine distinkte Bande auf Höhe des erwarteten apparenten Molekulargewichtes von ca. 50 kDa. Bei Färbung mittels Coomassie ist keine Proteinbande oberhalb von 50 kDa festzustellen, sodass eine intermolekulare Verknüpfung, wie sie bei Sortase A beobachtet wurde, ausgeschlossen werden kann.^[100,101,217]

Die Produktausbeute bei der Modifizierung des Her2-spezifischen Fab-Fragmentes mit Carboxyfluorescein konnte im Vergleich zur nativen Trypsiligase deutlich gesteigert werden.^[131] So erzielte Trypsiligase unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen mit zwei-, fünf- und zehnfachem Überschuss an Nukleophil (H-RHAK(CF)-OH) Produktausbeuten von ca. 15 %, 25 % sowie 40 %, während mit der Trypsiligase-Variante 2G10 Produktausbeuten von 46 %, 68 % sowie 76 % erreicht wurden. Auch hier korrelieren die erhaltenen Produktausbeuten mit

dem Syntheseprofil für die Transamidierung mittels Modellpeptiden. Im Vergleich zur nativen Sortase A erzielt die Trypsiligase-Variante 2G10 ähnliche Ausbeuten, da vergleichbare Überschüsse an Acylakzeptor eingesetzt werden.

So haben beispielsweise KORNBERGER *et al.* das von Trastuzumab abgeleitete Her2-spezifische Fab-Fragment, welches am C-Terminus der schweren Kette mit der Erkennungssequenz LPETG ausgestattet wurde, mit dem rekombinant hergestellten Pflanzentoxin Gelonin modifiziert, welches wiederum am N-Terminus mit zwei Glycinen als Nukleophil ausgestattet wurde.^[93] Hierbei wurde das Gelonin als Acylakzeptor im 1,5-fachen Überschuss eingesetzt. Der Verlauf der Modifikation wurde mittels SDS-PAGE analysiert, wobei eine neue Bande bei einem apparent höheren Molekulargewicht auszumachen ist.

In Bezug zu den Banden des unmodifizierten sowie hydrolysierten Fab-Fragmentes erreichte die Bande des Modifizierungsproduktes eine vergleichbare Intensität, sodass hier von einer Produktausbeute zwischen 30-40 % ausgegangen werden kann. Im Rahmen der Dissertation von J. ROBKOPF (AG KOLMAR, TU Darmstadt) zur Evaluierung eines neuartigen ADC-Formates, bei welchem die *hinge*-Region des Antikörpers mit einer spezifischen Erkennungssequenz für die tumorassoziierten Proteasen *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) und Matriptase (MT-SP1) ausgestattet wurde, erfolgte die Konjugation eines Auristatin-Derivates (MMAE und MMAF) mittels nativer Sortase A.^[223] Modifiziert wurden Trastuzumab sowie Cetuximab in Form der Volllängenantikörper sowie davon abgeleitete Fab-Fragmente, wobei der C-Terminus der leichten Kette mit der Erkennungssequenz von Sortase A ausgestattet wurde. Für die Modifizierung wurden mit Toxin beladene Nukleophile (Gly₃-vc-PABC-MMAE oder Gly₃-vc-PABC-MMAF) im zehnfachen Überschuss je Erkennungssequenz eingesetzt. Die auf dem Volllängenantikörper von Trastuzumab basierenden ADCs besaßen hierbei einen DAR zwischen 1,7-1,9 und der DAR der entsprechenden Fab-Fragmente lag bei 0,7-0,9. Die hieraus abgeleitete Produktausbeute liegt entsprechend bei 70-90 %. Für Cetuximab konnte beim Volllängenantikörper lediglich ein DAR von 1,1-1,3 erhalten werden, was einer Produktausbeute von 50-70 % entspricht und für die entsprechenden Fab-Fragmente konnte wiederum ein DAR von 0,8 erreicht werden. Weiterhin wurde eine deglykosylierte Variante von Trastuzumab (N297A) sowie dessen Fab-Fragment mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 modifiziert, wobei DARs von 1,6 bzw. 0,8 erzielt wurden, was wiederum einer Produktausbeute von 80 % je Erkennungssequenz entspricht.^[223] Somit liegt die Ausbeute von 76,5 %, welche die Trypsiligase-Variante 2G10 bei einem zehnfachen Überschuss an Nukleophil erzielte, im Bereich der Produktausbeute von Sortase A.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Variation des zu modifizierenden Proteins keinen wesentlichen Einfluss auf die Syntheseeffizienz der Trypsiligase-Variante 2G10 hat. So ergibt sich bei der Modifikation des Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc mit H-RHAK(CF)-OH (eingesetzt im fünffachen Überschuss) ein vergleichbarer Zeitverlauf der Produktbildung wie für Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc, was sich letztlich in einer ähnlichen Produktausbeute (65,9 % vs. 68,9 %) sowie Aminolysegeschwindigkeit ($0,0131 \text{ s}^{-1}$ vs $0,0128 \text{ s}^{-1}$) widerspiegelt (vgl. Tab. 33, S. 122 und Tab. 34, S. 125). Auch bei Variation des Acylakzeptors konnten vergleichbare Ergebnisse für die Modifikation der beiden Fab-Fragmente erhalten werden. Sowohl die Modifikation des Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc mit dem hydrophoben Spindeltoxin DM1 (H-RHAK(MCC-DM1)-OH), als auch die Modifikation des Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc mit dem sterisch anspruchsvollen PEG20.000 (H-RHAK(PEG20k)AAK(DNP)-OH) lieferten Produktausbeuten sowie Modifizierungsgeschwindigkeiten, welche mit dem Referenznukleophil H-RHAK(CF)-OH vergleichbar waren (vgl. Tab. 33, S. 122 und Tab. 34, S. 125). Somit scheinen sowohl die Funktionalität, welche über eine Lysinseitenkette an das Nukleophil gekoppelt ist, als auch die Natur der Protein-komponente, welche mit der enzymatischen Erkennungssequenz ausgestattet ist, keinen signifikanten Einfluss auf die Syntheseeffizienz der Trypsiligase-Variante 2G10 zu haben.

Final wurde der Einfluss der enzymkatalysierten Modifikation auf die Bindungsfunktionalität der beiden Fab-Fragmente untersucht. Hierzu wurden die unterschiedlich funktionalisierten Fab-Fragmente Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(CF), Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(MCC-DM1), Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(CF) und Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(PEG20k)AAK(DNP) durch chromatographische Ein- oder Zweischrittverfahren isoliert (vgl. 4.6.3, S. 125). Die Bindungsfunktionalität wurde anschließend mittels direktem konzentrationsabhängigen *ELISA* untersucht, wobei für die funktionalisierten Derivate des Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc das Peptidmimetikum Biotin-LLGPYELWELSH-OH als Ligand verwendet wurde und für die funktionalisierten Derivate des Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc rekombinant hergestelltes TNF α (vgl. 4.6.3, S. 125). Hierbei zeigte sich, dass die modifizierten Fab-Fragmente Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(CF) und Anti-Her2-Fab-TAAYRHAK(MCC-DM1) mit K_D -Werten von $0,80$ und $0,78 \mu\text{M}$ vergleichbare Bindungsaffinitäten zum Peptidmimetikum aufweisen wie das nicht modifizierte Anti-Her2-Fab-TAAYRH-cMyc mit $1,6 \mu\text{M}$. Der gleiche Befund ergab sich für die TNF α -spezifischen Fab-Fragmente. Hier konnte für die modifizierten Derivate Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(CF) und Anti-TNF α -Fab-TAAYRHAK(PEG20k)AAK(DNP) ein K_D -Wert von $1,79$ bzw. $1,18 \text{ nM}$ bestimmt werden und für das nicht modifizierte Anti-TNF α -Fab-TAAYRH-cMyc ein K_D -

Wert von 1,79 nM. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die Bindungsfunktionalität der Fab-Fragmente durch die enzymkatalysierte Modifikation nicht beeinträchtigt wird, was vermutlich aus der räumlichen Distanz von Paratop (im Bereich des *N*-Terminus) und Erkennungssequenz (*C*-Terminus der schweren Kette) resultiert.

6 Weiterführende Arbeiten und Ausblick

Die im Rahmen dieser Dissertation etablierten Methoden, welche das optimierte Phagen-Display zur Selektion verbesserter Biokatalysatoren sowie das *ELISA*-basierte Hochdurchsatz-Screening zur Identifizierung dieser umfassten, haben maßgeblich zur Entwicklung synthetisch wertvoller Biokatalysatoren beigetragen. So konnten diese Methoden erfolgreich im Rahmen der Dissertation von R. WARTNER (AG BORDUSA, MLU Halle-Wittenberg) eingesetzt werden. Unter Verwendung einer neuen Trypsiligase-basierten DNA-Bibliothek mit Randomisierungspositionen, welche sich im Wesentlichen in den S-Bindungstaschen von Trypsiligase befinden, gelang es Herrn WARTNER, mehrere Biokatalysatoren zu identifizieren, welche eine deutlich gesteigerte Syntheseeffizienz besitzen. Da die vielversprechendste Trypsiligase-Variante, welche von Herrn WARTNER erzeugt wurde, sowie die in dieser Arbeit erzeugte Trypsiligase-Variante 2G10 über unterschiedliche Mutationen verfügen, konnte in einer weiterführenden Arbeit eine Hybridvariante generiert werden, bei welcher die Mutationen der Einzelvarianten kombiniert wurden. Aufgrund von synergistischen Effekten wies dieser als, TN1BW bezeichnete Biokatalysator, nochmals eine verbesserte Syntheseeffizienz hinsichtlich der C-terminalen Modifikation von Proteinen mit der Erkennungssequenz YRH auf.^[224,225]

Aktuell wird diese Hybridvariante in der Dissertationsarbeit von Frau J. VOIGT (AG BORDUSA, MLU Halle-Wittenberg) hinsichtlich ihrer Eignung zur Herstellung neuartiger bispezifischer Antikörperformate evaluiert. Desweiteren konnten die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation sowie die Ergebnisse der Dissertation von Herrn WARTNER in ein anwendungsorientiertes Kooperationsprojekt mit der BioPharma Translationsinstitut Dessau Forschungs GmbH translatiert werden. Dieses, durch das Land Sachsen-Anhalt geförderte Projekt mit dem Titel „Entwicklung eines bisher nicht patentgeschützten Enzyms für die Erzeugung therapeutischer Proteine (insb. zur Krebstherapie)“ konnte erfolgreich umgesetzt werden und führte zur Anmeldung von zwei Patenten (WO2020094840 und WO2020127808) sowie einer Markenmeldung für die hieraus resultierende Plattformtechnologie TrypCo[®]. So konnten sehr effiziente Biokatalysatoren generiert werden, welche auf Trypsiligase II basieren. Hierbei handelt es sich um eine Trypsinvariante mit den Mutationen Y39H/Y59H/K60E/D189K, welche in der Dissertationsarbeit von Herrn C. MEYER (AG BORDUSA, MLU Halle-Wittenberg) rational designt wurde.^[226] Desweiteren soll die Plattformtechnologie als Grundlage für eine Firmengründung dienen, wobei der Fokus auf der Lizenzierung der TrypCo[®]-Technologie sowie auf der Entwicklung eigener Antikörper-Wirkstoff-Konjugate liegt. Da es gelungen ist, mehrere

Enzymvarianten mit verschiedenen Erkennungssequenzen zu generieren, ermöglicht die TrypCo[®]-Technologie die orthogonale ortsspezifische Konjugation unterschiedlicher Funktionalitäten (Toxine, Farbstoffe, Polymere, Radionuklide, etc.) innerhalb eines Antikörpers. Dies erlaubt die Herstellung neuartiger ADC-Formate, wie beispielsweise bispezifische ADCs (posttranslationale Modifikation mit einer zusätzlichen artifiziellen Antigenbindungsdomäne) oder Dual-Drug-ADCs (anknüpfen von zwei unterschiedlichen Toxinen mit synergistischem Wirkmechanismus).

Neben diesem anwendungsorientierten Ausblick gibt es auch im Bereich der Grundlagenforschung vielfältige Fragestellungen. Vordergründig hierbei wären Untersuchungen zum Einfluss der Mutationen auf die katalysierten Transamidierungsreaktionen und die Faktoren, die die Deacylierung mittels Aminolyse anstatt einer Hydrolyse begünstigen. Erste Hinweise hierzu konnten in dieser Arbeit sowie in der Masterarbeit von Frau C. SCHMIDT (AG BORDUSA, MLU Halle-Wittenberg) aufgezeigt werden. Ergänzend hierzu könnte eine Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie wertvolle Erkenntnisse hinsichtlich der strukturellen Einflüsse der einzelnen Aminosäureaustausche im Vergleich zur nativen Trypsiligase liefern. Weiterhin könnte auch versucht werden, mit Hilfe des optimierten Enzym-Engineerings neue Trypsiligase-Varianten zu entwickeln, welche über eine veränderte Substratspezifität verfügen. Insbesondere eine Variation der Spezifität im S'-Bereich, die zu einer alternativen Erkennungssequenz im P'-Bereich führt, wäre wünschenswert. Dies würde duale Modifikationen im Einschnittverfahren ohne zusätzliche Reinigungsschritte ermöglichen. Im Hinblick auf die Modifikation von therapeutischen Proteinen ist auch die Selektion von Trypsinvarianten, welche keine Abhängigkeit für Metallionen besitzen, ein wünschenswertes Ziel.

7 Literaturverzeichnis

- [1] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44*, 7342–7372.
- [2] O. Koniev, A. Wagner, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 5495–5551.
- [3] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science (80-.)*. **1994**, *266*, 776–779.
- [4] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 6705–6710.
- [5] K. Lang, J. W. Chin, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4764–4806.
- [6] T. Nuijens, A. Toplak, M. Schmidt, A. Ricci, W. Cabri, *Front. Chem.* **2019**, *7*, 1–8.
- [7] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.
- [8] M. Swierczewska, K. C. Lee, S. Lee, *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2015**, *20*, 531–536.
- [9] J. K. Dozier, M. D. Distefano, *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 25831–25864.
- [10] F. J. Torriani, M. Rodriguez-Torres, J. K. Rockstroh, E. Lissen, J. Gonzalez-García, A. Lazzarin, G. Carosi, J. Sasadeusz, C. Katlama, J. Montaner, H. Sette, S. Pässe, J. De Pamphilis, F. Duff, U. M. Schrenk, D. T. Dieterich, *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 438–450.
- [11] M. Goldfinger, W. L. Zeile, C. R. Corado, C. A. O’Neill, L. S. Tsuruda, P. J. Laipis, J. D. Cooper, *Mol. Genet. Metab.* **2017**, *122*, 33–35.
- [12] W. J. Sandborn, B. G. Feagan, S. Stoinov, P. J. Honiball, P. Rutgeerts, D. Mason, R. Bloomfield, S. Schreiber, *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 228–238.
- [13] A. Beck, L. Goetsch, C. Dumontet, N. Corvaia, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 315–337.
- [14] P. Carter, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 118–29.
- [15] C. D. Godwin, R. P. Gale, R. B. Walter, *Leukemia* **2017**, *31*, 1855–1868.
- [16] P. R. Hamann, L. M. Hinman, I. Hollander, C. F. Beyer, D. Lindh, R. Holcomb, W. Hallett, H.-R. Tsou, J. Upeslakis, D. Shochat, A. Mountain, D. a Flowers, I. Bernstein, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 47–58.
- [17] P. F. Bross, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 1490–1496.
- [18] J. A. Francisco, C. G. Cerveny, D. L. Meyer, B. J. Mixan, K. Klussman, D. F. Chace, S. X. Rejniak, K. A. Gordon, R. DeBlanc, B. E. Toki, C. L. Law, S. O. Doronina, C. B. Siegall, P. D. Senter, A. F. Wahl, *Blood* **2003**, *102*, 1458–1465.
- [19] P. D. Senter, E. L. Sievers, *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 631–637.
- [20] G. D. Lewis Phillips, G. Li, D. L. Dugger, L. M. Crocker, K. L. Parsons, E. Mai, W. a. Blättler, J. M. Lambert, R. V. J. Chari, R. J. Lutz, W. L. T. Wong, F. S. Jacobson, H. Koeppen, R. H. Schwall, S. R. Kenkare-Mitra, S. D. Spencer, M. X. Sliwowski, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 9280–9290.
- [21] J. M. Lambert, R. V. J. Chari, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6949–6964.

- [22] J. F. DiJoseph, D. C. Armellino, E. R. Boghaert, K. Khandke, M. M. Dougher, L. Sridharan, A. Kunz, P. R. Hamann, B. Gorovits, C. Udata, J. K. Moran, A. G. Popplewell, S. Stephens, P. Frost, N. K. Damle, *Blood* **2004**, *103*, 1807–1814.
- [23] Y. N. Lamb, *Drugs* **2017**, *77*, 1603–1610.
- [24] E. D. Deeks, *Drugs* **2019**, *79*, 1467–1475.
- [25] P. M. Challita-Eid, D. Satpayev, P. Yang, Z. An, K. Morrison, Y. Shostak, A. Raitano, R. Nadell, W. Liu, D. R. Lortie, L. Capo, A. Verlinsky, M. Leavitt, F. Malik, H. Avina, C. I. Guevara, N. Dinh, S. Karki, B. S. Anand, D. S. Pereira, I. B. J. Joseph, F. Donate, K. Morrison, D. R. Stover, *Cancer Res.* **2016**, *76*, 3003–3013.
- [26] D. P. Petrylak, R. P. Perez, J. Zhang, D. C. Smith, J. D. Ruether, S. S. Sridhar, R. S. Sangha, J. M. Lang, E. I. Heath, J. R. Merchan, E. M. Gartner, R. Chu, B. Anand, F. Doñate, L. Jackson, J. Adams, A. Melhem-Bertrandt, J. E. Rosenberg, *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 106–106.
- [27] T. Nakada, K. Sugihara, T. Jikoh, Y. Abe, T. Agatsuma, *Chem. Pharm. Bull.* **2019**, *67*, 173–185.
- [28] S. Modi, C. Saura, T. Yamashita, Y. H. Park, S.-B. Kim, K. Tamura, F. Andre, H. Iwata, Y. Ito, J. Tsurutani, J. Sohn, N. Denduluri, C. Perrin, K. Aogi, E. Tokunaga, S.-A. Im, K. S. Lee, S. A. Hurvitz, J. Cortes, C. Lee, S. Chen, L. Zhang, J. Shahidi, A. Yver, I. Krop, *N. Engl. J. Med.* **2019**, NEJMoA1914510.
- [29] K. Tamura, J. Tsurutani, S. Takahashi, H. Iwata, I. E. Krop, C. Redfern, Y. Sagara, T. Doi, H. Park, R. K. Murthy, R. A. Redman, T. Jikoh, C. Lee, M. Sugihara, J. Shahidi, A. Yver, S. Modi, *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 816–826.
- [30] A. Bardia, I. A. Mayer, L. T. Vahdat, S. M. Tolaney, S. J. Isakoff, J. R. Diamond, J. O’Shaughnessy, R. L. Moroose, A. D. Santin, V. G. Abramson, N. C. Shah, H. S. Rugo, D. M. Goldenberg, A. M. Sweidan, R. Iannone, S. Washkowitz, R. M. Sharkey, W. A. Wegener, K. Kalinsky, *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 741–751.
- [31] D. M. Goldenberg, R. M. Sharkey, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2020**, *20*, 871–885.
- [32] Y.-T. Tai, P. A. Mayes, C. Acharya, M. Y. Zhong, M. Cea, A. Cagnetta, J. Craigen, J. Yates, L. Gliddon, W. Fieles, B. Hoang, J. Tunstead, A. L. Christie, A. L. Kung, P. Richardson, N. C. Munshi, K. C. Anderson, *Blood* **2014**, *123*, 3128–3138.
- [33] S. Trudel, N. Lendvai, R. Popat, P. M. Voorhees, B. Reeves, E. N. Libby, P. G. Richardson, A. Hoos, I. Gupta, V. Bragulat, Z. He, J. B. Opalinska, A. D. Cohen, *Blood Cancer J.* **2019**, *9*, DOI 10.1038/s41408-019-0196-6.
- [34] B. F. Issell, S. T. Crooke, *Cancer Treat. Rev.* **1978**, *5*, 199–207.
- [35] U. Vaishampayan, M. Glode, W. Du, A. Kraft, G. Hudes, J. Wright, M. Hussain, *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 4205–8.
- [36] R. V. J. Chari, M. L. Miller, W. C. Widdison, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*, 3796–3827.
- [37] C. Peters, S. Brown, *Biosci. Rep.* **2015**, *35*, e00225–e00225.
- [38] M. Ritchie, L. Tchistiakova, N. Scott, *MAbs* **2013**, *5*, 13–21.
- [39] B. A. Teicher, R. V. J. Chari, *Clin Cancer Res* **2011**, *17*, 6389–6397.
- [40] W. Wang, E. Q. Wang, J. P. Balthasar, *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *84*, 548–58.

- [41] R. W. Schroff, K. A. Foon, S. M. Beatty, R. K. Oldham, A. C. Morgan, *Cancer Res.* **1985**, *45*, 879–85.
- [42] R. V. J. Chari, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 98–107.
- [43] H. K. Erickson, W. C. Widdison, M. F. Mayo, K. Whiteman, C. Audette, S. D. Wilhelm, R. Singh, *Bioconjugate Chem. Chem.* **2010**, *21*, 84–92.
- [44] G. M. Dubowchik, R. A. Firestone, L. Padilla, D. Willner, S. J. Hofstead, K. Mosure, J. O. Knipe, S. J. Lasch, P. A. Trail, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 855–69.
- [45] S. C. Jeffrey, J. B. Andreyka, S. X. Bernhardt, K. M. Kissler, T. Kline, J. S. Lenox, R. F. Moser, M. T. Nguyen, N. M. Okeley, I. J. Stone, X. Zhang, P. D. Senter, *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 831–840.
- [46] H. K. Erickson, P. U. Park, W. C. Widdison, Y. V. Kovtun, L. M. Garrett, K. Hoffman, R. J. Lutz, V. S. Goldmacher, W. A. Blättler, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4426–33.
- [47] S. O. Doronina, B. A. Mendelsohn, T. D. Bovee, C. G. Cerveny, S. C. Alley, D. L. Meyer, E. Oflazoglu, B. E. Toki, R. J. Sanderson, R. F. Zabinski, A. F. Wahl, P. D. Senter, *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 114–24.
- [48] N. Jain, S. W. Smith, S. Ghone, B. Tomczuk, *Pharm. Res.* **2015**, DOI 10.1007/s11095-015-1657-7.
- [49] A. Beck, L. Goetsch, C. Dumontet, N. Corvaia, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 315–337.
- [50] M. T. Kim, Y. Chen, J. Marhoul, F. Jacobson, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1223–1232.
- [51] L. Chen, L. Wang, H. Shion, C. Yu, Y. Q. Yu, L. Zhu, M. Li, W. Chen, K. Gao, *MAbs* **2016**, *8*, 1210–1223.
- [52] K. J. Hamblett, P. D. Senter, D. F. Chace, M. M. C. Sun, J. Lenox, C. G. Cerveny, K. M. Kissler, S. X. Bernhardt, A. K. Kopcha, R. F. Zabinski, D. L. Meyer, J. A. Francisco, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7063–70.
- [53] R. P. Lyon, T. D. Bovee, S. O. Doronina, P. J. Burke, J. H. Hunter, H. D. Neff-LaFord, M. Jonas, M. E. Anderson, J. R. Setter, P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 733–736.
- [54] R. Dere, J.-H. Yi, C. Lei, O. M. Saad, C. Huang, Y. Li, J. Baudys, S. Kaur, *Bioanalysis* **2013**, *5*, 1025–40.
- [55] R. P. Lyon, J. R. Setter, T. D. Bovee, S. O. Doronina, J. H. Hunter, M. E. Anderson, C. L. Balasubramanian, S. M. Duniho, C. I. Leiske, F. Li, P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 1059–1062.
- [56] M. M. C. Sun, K. S. Beam, C. G. Cerveny, K. J. Hamblett, R. S. Blackmore, M. Y. Torgov, F. G. M. Handley, N. C. Ihle, P. D. Senter, S. C. Alley, *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 1282–90.
- [57] K. J. Hamblett, P. D. Senter, D. F. Chace, M. M. C. Sun, J. Lenox, C. G. Cerveny, K. M. Kissler, S. X. Bernhardt, A. K. Kopcha, R. F. Zabinski, D. L. Meyer, J. A. Francisco, **2004**, 7063–7070.
- [58] P. Bryant, M. Pabst, G. Badescu, M. Bird, W. McDowell, E. Jamieson, J. Swierkosz, K. Jurlewicz, R. Tommasi, K. Henseleit, X. Sheng, N. Camper, A. Manin, K. Kozakowska, K. Peciak, E. Laurine, R. Grygorash, A. Kyle, D. Morris, V. Parekh, A. Abhilash, J. W. Choi, J. Edwards, M. Frigerio, M. P. Baker, A. Godwin, *Mol. Pharm.*

- 2015**, *12*, 1872–1879.
- [59] F. Tian, Y. Lu, A. Manibusan, A. Sellers, H. Tran, Y. Sun, T. Phuong, R. Barnett, B. Hehli, F. Song, M. J. DeGuzman, S. Ensari, J. K. Pinkstaff, L. M. Sullivan, S. L. Biroc, H. Cho, P. G. Schultz, J. DiJoseph, M. Dougher, D. Ma, R. Dushin, M. Leal, L. Tchistiakova, E. Feyfant, H.-P. Gerber, P. Sapra, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 1766–1771.
- [60] H. Liu, K. May, *MAbs* **2012**, *4*, 17–23.
- [61] J. A. Flygare, T. H. Pillow, P. Aristoff, *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81*, 113–121.
- [62] J. P. M. Nunes, M. Morais, V. Vassileva, E. Robinson, V. S. Rajkumar, M. E. B. Smith, R. B. Pedley, S. Caddick, J. R. Baker, V. Chudasama, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10624–10627.
- [63] C. F. McDonagh, E. Turcott, L. Westendorf, J. B. Webster, S. C. Alley, K. Kim, J. Andreyka, I. Stone, K. J. Hamblett, J. A. Francisco, P. Carter, *Protein Eng. Des. Sel.* **2006**, *19*, 299–307.
- [64] G. W. Seegan, C. A. Smith, V. N. Schumaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76*, 907–11.
- [65] T. E. Michaelsen, O. H. Brekke, A. Aase, R. H. Sandin, B. Bremnest, I. Sandliet, *Immunology* **1994**, *91*, 9243–9247.
- [66] J. R. Junutula, S. Bhakta, H. Raab, K. E. Ervin, C. Eigenbrot, R. Vandlen, R. H. Scheller, H. B. Lowman, *J. Immunol. Methods* **2008**, *332*, 41–52.
- [67] J. R. J. R. Junutula, H. Raab, S. Clark, S. Bhakta, D. D. D. Leipold, Y. Chen, M. Simpson, S. P. S. P. Tsai, M. S. M. S. Dennis, Y. Lu, G. Meng, C. Ng, J. Yang, C. C. Lee, E. Duenas, J. Gorrell, V. Katta, A. Kim, K. McDorman, K. Flagella, R. Venook, S. Ross, S. D. Spencer, W. L. Wong, H. B. Lowman, R. Vandlen, M. X. Sliwkowski, R. H. Scheller, P. Polakis, W. Mallet, D. N. A. Way, S. S. Francisco, S. Weir, Y. Chen, M. Simpson, S. P. S. P. Tsai, M. S. M. S. Dennis, Y. Lu, Y. G. Meng, C. Ng, J. Yang, C. C. Lee, E. Duenas, J. Gorrell, V. Katta, A. Kim, K. McDorman, K. Flagella, R. Venook, S. Ross, S. D. Spencer, W. Lee Wong, H. B. Lowman, R. Vandlen, M. X. Sliwkowski, R. H. Scheller, P. Polakis, W. Mallet, others, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 925–32.
- [68] J. R. Junutula, K. M. Flagella, R. A. Graham, K. L. Parsons, E. Ha, H. Raab, S. Bhakta, T. Nguyen, D. L. Dugger, G. Li, E. Mai, G. D. L. Phillips, H. Hiraragi, R. N. Fuji, J. Tibbitts, R. Vandlen, S. D. Spencer, R. H. Scheller, P. Polakis, M. X. Sliwkowski, *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 4769–4778.
- [69] J. Y. Li, S. R. Perry, V. Muniz-Medina, X. Wang, L. K. Wetzel, M. C. Rebelatto, M. J. M. Hinrichs, B. Z. Bezabeh, R. L. Fleming, N. Dimasi, H. Feng, D. Toader, A. Q. Yuan, L. Xu, J. Lin, C. Gao, H. Wu, R. Dixit, J. K. Osbourn, S. R. Coats, *Cancer Cell* **2016**, *29*, 117–129.
- [70] M. S. K. Sutherland, R. B. Walter, S. C. Jeffrey, P. J. Burke, C. Yu, H. Kostner, I. Stone, M. C. Ryan, D. Sussman, R. P. Lyon, W. Zeng, K. H. Harrington, K. Klussman, L. Westendorf, D. Meyer, I. D. Bernstein, P. D. Senter, D. R. Benjamin, J. G. Drachman, J. A. McEarchern, *Blood* **2013**, *122*, 1455–1463.
- [71] F. F. Schumacher, J. P. M. Nunes, A. Maruani, V. Chudasama, M. E. B. Smith, K. A. Chester, J. R. Baker, S. Caddick, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 7261–9.

- [72] C. R. Behrens, E. H. Ha, L. L. Chinn, S. Bowers, G. Probst, M. Fitch-Bruhns, J. Monteon, A. Valdiosera, A. Bermudez, S. Liao-Chan, T. Wong, J. Melnick, J.-W. Theunissen, M. R. Flory, D. Houser, K. Venstrom, Z. Levashova, P. Sauer, T.-S. Migone, E. H. van der Horst, R. L. Halcomb, D. Y. Jackson, *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 3986–98.
- [73] E. Robinson, J. P. M. Nunes, V. Vassileva, A. Maruani, J. C. F. Nogueira, M. E. B. Smith, R. B. Pedley, S. Caddick, J. R. Baker, V. Chudasama, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 9073–9077.
- [74] G. Badescu, P. Bryant, M. Bird, K. Henseleit, J. Swierkosz, V. Parekh, R. Tommasi, E. Pawlisz, K. Jurlewicz, M. Farys, N. Camper, X. Sheng, M. Fisher, R. Grygorash, A. Kyle, A. Abhilash, M. Frigerio, J. Edwards, A. Godwin, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1124–1136.
- [75] M. Morais, J. P. M. Nunes, K. Karu, N. Forte, I. Benni, M. E. B. Smith, S. Caddick, V. Chudasama, J. R. Baker, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2947–2952.
- [76] C. R. Behrens, E. H. Ha, L. L. Chinn, S. Bowers, G. Probst, M. Fitch-Bruhns, J. Monteon, A. Valdiosera, A. Bermudez, S. Liao-Chan, T. Wong, J. Melnick, J.-W. Theunissen, M. R. Flory, D. Houser, K. Venstrom, Z. Levashova, P. Sauer, T.-S. Migone, E. H. van der Horst, R. L. Halcomb, D. Y. Jackson, *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 3986–3998.
- [77] T. J. Hallam, E. Wold, A. Wahl, V. V. Smider, *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 1848–62.
- [78] B. Q. Shen, K. Xu, L. Liu, H. Raab, S. Bhakta, M. Kenrick, K. L. Parsons-Reponte, J. Tien, S. F. Yu, E. Mai, D. Li, J. Tibbitts, J. Baudys, O. M. Saad, S. J. Scales, P. J. McDonald, P. E. Hass, C. Eigenbrot, T. Nguyen, W. A. Solis, R. N. Fuji, K. M. Flagella, D. Patel, S. D. Spencer, L. A. Khawli, A. Ebens, W. L. Wong, R. Vandlen, S. Kaur, M. X. Sliwkowski, R. H. Scheller, P. Polakis, J. R. Junutula, *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 184–189.
- [79] J. Y. Axup, K. M. Bajjuri, M. Ritland, B. M. Hutchins, C. H. Kim, S. a. Kazane, R. Halder, J. S. Forsyth, a. F. Santidrian, K. Stafin, Y. Lu, H. Tran, a. J. Seller, S. L. Biroc, a. Szydlak, J. K. Pinkstaff, F. Tian, S. C. Sinha, B. Felding-Habermann, V. V. Smider, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 16101–16106.
- [80] Q. Cai, J. A. Hanson, A. R. Steiner, C. Tran, M. R. Masikat, R. Chen, J. F. Zawada, A. K. Sato, T. J. Hallam, G. Yin, *Biotechnol. Prog.* **2015**, *31*, 823–831.
- [81] E. S. Zimmerman, T. H. Heibeck, A. Gill, X. Li, C. J. Murray, M. R. Madlansacay, C. Tran, N. T. Uter, G. Yin, P. J. Rivers, A. Y. Yam, W. D. Wang, A. R. Steiner, S. U. Bajad, K. Penta, W. Yang, T. J. Hallam, C. D. Thanos, A. K. Sato, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 351–361.
- [82] Y. Mimura, S. Church, R. Ghirlando, P. R. Ashton, S. Dong, M. Goodall, J. Lund, R. Jefferis, *Mol. Immunol.* **2001**, *37*, 697–706.
- [83] S. C. Jeffrey, P. J. Burke, R. P. Lyon, D. W. Meyer, D. Sussman, M. Anderson, J. H. Hunter, C. I. Leiske, J. B. Miyamoto, N. D. Nicholas, N. M. Okeley, R. J. Sanderson, I. J. Stone, W. Zeng, S. J. Gregson, L. Masterson, A. C. Tiberghien, P. W. Howard, D. E. Thurston, C. L. Law, P. D. Senter, *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 1256–1263.
- [84] M. P. Vanbrunt, K. Shanebeck, Z. Caldwell, J. Johnson, P. Thompson, T. Martin, H. Dong, G. Li, H. Xu, F. D’Hooge, L. Masterson, P. Bariola, A. Tiberghien, E. Ezeadi, D. G. Williams, J. A. Hartley, P. W. Howard, K. H. Grabstein, M. A. Bowen, M.

- Marelli, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 2249–2260.
- [85] T. Spirig, E. M. Weiner, R. T. Clubb, *Mol. Microbiol.* **2011**, *82*, 1044–59.
- [86] K. W. Clancy, J. A. Melvin, D. G. McCafferty, *Biopolymers* **2010**, *94*, 385–96.
- [87] M. W.-L. Popp, H. L. Ploegh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5024–32.
- [88] H. Mao, S. a Hart, A. Schink, B. a Pollok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2670–2671.
- [89] L. Schmohl, D. Schwarzer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *22*, 122–128.
- [90] M. Ritzefeld, *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20*, 8516–8529.
- [91] J. M. Antos, M. C. Truttmann, H. L. Ploegh, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *38*, 111–118.
- [92] J. M. Antos, J. Ingram, T. Fang, N. Pishesha, M. C. Truttmann, H. L. Ploegh, in *Curr. Protoc. Protein Sci.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **2017**, p. 15.3.1-15.3.19.
- [93] P. Kornberger, A. Skerra, *MAbs* **2014**, *6*, 354–366.
- [94] K. Alt, B. M. Paterson, E. Westein, S. E. Rudd, S. S. Poniger, S. Jagdale, K. Ardipradja, T. U. Connell, G. Y. Krippner, A. K. N. Nair, X. Wang, H. J. Tochon-Danguy, P. S. Donnelly, K. Peter, C. E. Hagemeyer, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, n/a-n/a.
- [95] L. K. Swee, C. P. Guimaraes, S. Sehrawat, E. Spooner, M. I. Barrasa, H. L. Ploegh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 1428–33.
- [96] C. F. Greineder, C. H. Villa, L. R. Walsh, R. Y. Kiseleva, E. D. Hood, M. Khoshnejad, R. Warden-Rothman, A. Tsourkas, V. R. Muzykantov, *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 56–66.
- [97] R. R. Beerli, T. Hell, A. S. Merkel, U. Grawunder, *PLoS One* **2015**, *10*, e0131177.
- [98] I. Chen, B. M. Dorr, D. R. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 11399–404.
- [99] N. Stefan, R. Gébleux, L. Waldmeier, T. Hell, M. Escher, F. I. Wolter, U. Grawunder, R. R. Beerli, *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 879–892.
- [100] S. Möhlmann, C. Mahlert, S. Greven, P. Scholz, A. Harrenga, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1774–1780.
- [101] T. Heck, P.-H. Pham, A. Yerlikaya, L. Thöny-Meyer, M. Richter, *Catal. Sci. Technol.* **2014**, *4*, 2946–2956.
- [102] M. Knop, T. Q. Dang, G. Jeschke, F. P. Seebeck, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 161–165.
- [103] T. Dierks, B. Schmidt, L. V Borissenko, J. Peng, A. Preusser, M. Mariappan, K. von Figura, *Cell* **2003**, *113*, 435–44.
- [104] I. S. Carrico, B. L. Carlson, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 321–2.
- [105] J. S. Rush, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12240–1.
- [106] D. Rabuka, J. S. Rush, G. W. DeHart, P. Wu, C. R. Bertozzi, *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1052–1067.
- [107] J. E. Hudak, R. M. Barfield, G. W. de Hart, P. Grob, E. Nogales, C. R. Bertozzi, D. Rabuka, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 4161–5.

- [108] P. Agarwal, R. Kudirka, A. E. Albers, R. M. Barfield, G. W. de Hart, P. M. Drake, L. C. Jones, D. Rabuka, *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 846–851.
- [109] R. Kudirka, R. M. Barfield, J. McFarland, A. E. Albers, G. W. de Hart, P. M. Drake, P. G. Holder, S. Banas, L. C. Jones, A. W. Garofalo, D. Rabuka, *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 293–298.
- [110] R. A. Kudirka, R. M. Barfield, J. M. McFarland, P. M. Drake, A. Carlson, S. Bañas, W. Zmolek, A. W. Garofalo, D. Rabuka, *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 994–998.
- [111] W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475–481.
- [112] P. M. Drake, A. E. Albers, J. Baker, S. Banas, R. M. Barfield, A. S. Bhat, G. W. de Hart, A. W. Garofalo, P. Holder, L. C. Jones, R. Kudirka, J. McFarland, W. Zmolek, D. Rabuka, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1331–1341.
- [113] M. Griffin, R. Casadio, C. M. Bergamini, *Biochem. J.* **2002**, *368*, 377–96.
- [114] M. Motoki, K. Seguro, *Trends Food Sci. Technol.* **1998**, *9*, 204–210.
- [115] S. E. Farias, P. Strop, K. Delaria, M. Galindo Casas, M. Dorywalska, D. L. Shelton, J. Pons, A. Rajpal, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 240–250.
- [116] S. Jeger, K. Zimmermann, A. Blanc, J. Grünberg, M. Honer, P. Hunziker, H. Struthers, R. Schibli, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 9995–7.
- [117] A. Fontana, B. Spolaore, A. Mero, F. M. Veronese, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 13–28.
- [118] P. Dennler, R. Schibli, E. Fischer, in (Ed.: L. Ducry), Humana Press, Totowa, NJ, **2013**, pp. 205–215.
- [119] F. Lhospice, D. Brégeon, C. Belmant, P. Dennler, A. Chiotellis, E. Fischer, L. Gauthier, A. Boëdec, H. Rispaud, S. Savard-Chambard, A. Represa, N. Schneider, C. Paturel, M. Sapet, C. Delcambre, S. Ingoure, N. Viaud, C. Bonnafous, R. Schibli, F. Romagné, *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 1863–1871.
- [120] P. Strop, S.-H. Liu, M. Dorywalska, K. Delaria, R. G. Dushin, T.-T. Tran, W.-H. Ho, S. Farias, M. G. Casas, Y. Abdiche, D. Zhou, R. Chandrasekaran, C. Samain, C. Loo, A. Rossi, M. Rickert, S. Krimm, T. Wong, S. M. Chin, J. Yu, J. Dilley, J. Chaparro-Riggers, G. F. Filzen, C. J. O'Donnell, F. Wang, J. S. Myers, J. Pons, D. L. Shelton, A. Rajpal, *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 161–167.
- [121] Q. Zhou, J. E. Stefano, C. Manning, J. Kyazike, B. Chen, D. A. Gianolio, A. Park, M. Busch, J. Bird, X. Zheng, H. Simonds-Mannes, J. Kim, R. C. Gregory, R. J. Miller, W. H. Brondyk, P. K. Dhal, C. Q. Pan, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 510–20.
- [122] R. van Geel, M. A. Wijdeven, R. Heesbeen, J. M. M. Verkade, A. A. Wasiel, S. S. van Berkel, F. L. van Delft, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 2233–2242.
- [123] J. M. M. Verkade, M. A. Wijdeven, R. Van Geel, B. M. G. Janssen, S. S. Van Berkel, F. L. Van Delft, *Antibodies* **2018**, *7*, 12.
- [124] C. Zhang, M. Welborn, T. Zhu, N. J. Yang, M. S. Santos, T. Van Voorhis, B. L. Pentelute, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 120–128.
- [125] S. Möhlmann, P. Bringmann, S. Greven, A. Harrenga, *BMC Biotechnol.* **2011**, *11*, 76.
- [126] F. Gehle, Polyionische Fusionspeptide Als Kopplungsmotiv in Immuntoxinen, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2016**.

- [127] U. Reinhardt, J. Lotze, K. Mörl, A. G. Beck-Sickinger, O. Seitz, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 2106–2117.
- [128] K. Gröger, G. Gavins, O. Seitz, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, *56*, 14217–14221.
- [129] S. Liebscher, M. Schöpfel, T. Aumüller, A. Sharkhuukhen, A. Pech, E. Höss, C. Parthier, G. Jahreis, M. T. Stubbs, F. Bordusa, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 3024–3028.
- [130] C. Meyer, S. Liebscher, F. Bordusa, *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 47–53.
- [131] S. Liebscher, P. Kornberger, G. Fink, E.-M. Trost-Gross, E. Höss, A. Skerra, F. Bordusa, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1096–1100.
- [132] A. Gautier, M. J. Hinner, *Site-Specific Protein Labeling Methods Protoc.* **2015**, 1–267.
- [133] S. Hauke, M. Best, T. T. Schmidt, M. Baalman, A. Krause, R. Wombacher, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1632–7.
- [134] V. Siegmund, B. Piater, B. Zakeri, T. Eichhorn, F. Fischer, C. Deutsch, S. Becker, L. Toleikis, B. Hock, U. A. K. Betz, H. Kolmar, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 39291.
- [135] K. Heller, P. Ochtrup, M. F. Albers, F. B. Zauner, A. Itzen, C. Hedberg, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, n/a-n/a.
- [136] T. Harmand, D. Bousbaine, A. I. Chan, X. Zhang, D. R. Liu, J. P. Tam, H. L. Ploegh, *Bioconjug. Chem.* **2018**, acs.bioconjchem.8b00563.
- [137] J. Grünewald, H. E. Klock, S. E. Cellitti, B. Bursulaya, D. McMullan, D. H. Jones, H.-P. Chiu, X. Wang, P. Patterson, H. Zhou, J. Vance, E. Nigoghossian, H. Tong, D. Daniel, W. Mallet, W. Ou, T. Uno, A. Brock, S. A. Lesley, B. H. Geierstanger, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 2554–62.
- [138] A. Stengl, M. Gerlach, M. A. Kasper, C. P. R. Hackenberger, H. Leonhardt, D. Schumacher, J. Helma, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 4964–4969.
- [139] D. Schumacher, J. Helma, F. A. Mann, G. Pichler, F. Natale, E. Krause, M. C. Cardoso, C. P. R. Hackenberger, H. Leonhardt, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, n/a-n/a.
- [140] N. Stefan, R. Gébleux, L. Waldmeier, T. Hell, M. Escher, F. I. Wolter, U. Grawunder, R. R. Beerli, *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 879–892.
- [141] P. Dennler, A. Chiotellis, E. Fischer, D. Brégeon, C. Belmant, L. Gauthier, F. Lhospice, F. Romagne, R. Schibli, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 569–78.
- [142] M. Dorywalska, R. Dushin, L. Moine, S. E. Farias, D. Zhou, T. Navaratnam, V. Lui, A. Hasa-Moreno, M. G. Casas, T.-T. Tran, K. Delaria, S.-H. Liu, D. Foletti, C. J. O'Donnell, J. Pons, D. L. Shelton, A. Rajpal, P. Strop, *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 958–970.
- [143] M. Bergmann, H. Fraenkel-Conrat, *J. Biol. Chem.* **1938**, *124*, 1–6.
- [144] H. BORSOOK, *Adv. Protein Chem.* **1953**, *8*, 127–74.
- [145] F. Bordusa, *Chem. Rev.* **2002**.
- [146] V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1991**, *30*, 1437–1449.
- [147] I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157–62.
- [148] H.-D. Jakubke, P. Kuhl, A. Könnecke, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1985**, *24*, 85–

- 93.
- [149] V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, N. P. Zapevalova, Y. V. Mitin, *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *38*, 104–108.
- [150] F. Bordusa, D. Ullmann, C. Elsner, H.-D. Jakubke, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1997**, *36*, 2473–2475.
- [151] R. Günther, S. Thust, H.-J. Hofmann, F. Bordusa, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 3496–3501.
- [152] K. Rall, Untersuchungen Zur Optimierung Der Serinprotease Trypsin Für Die Substratmimetika-Vermittelte Peptidsynthese, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2004**.
- [153] T. Kurth, S. Grahn, M. Thormann, D. Ullmann, H. J. Hofmann, H. D. Jakubke, L. Hedstrom, *Biochemistry* **1998**, *37*, 11434–11440.
- [154] S. Liebscher, N- Und C-Terminale Modifizierung von Polypeptiden Und Proteinen., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2008**.
- [155] W. S. Willett, S. A. Gillmor, J. J. Perona, R. J. Fletterick, C. S. Craik, *Biochemistry* **1995**, *34*, 2172–2180.
- [156] W. S. Willett, L. S. Brinen, R. J. Fletterick, C. S. Craik, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5992–5998.
- [157] L. Graf, C. S. Craik, A. Patthy, S. Rocznik, R. J. Fletterick, W. J. Rutter, *Biochemistry* **1987**, *26*, 2616–2623.
- [158] L. Gráf, a Jancsó, L. Szilágyi, G. Hegyi, K. Pintér, G. Náráy-Szabó, J. Hepp, K. Medzihradzsky, W. J. Rutter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 4961–4965.
- [159] S. Gissel, Etablierung Des Phage Display-Verfahrens Für Die Optimierung Der Trypsiligase, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2017**.
- [160] G. Smith, *Science (80-.)*. **1985**, *228*, 1315–1317.
- [161] E. T. Boder, K. D. Wittrup, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 553–557.
- [162] J. Hanes, A. Pluckthun, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 4937–4942.
- [163] R. W. Roberts, J. W. Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 12297–12302.
- [164] C. Neylon, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1448–1459.
- [165] A. C. Braisted, J. K. Judice, J. A. Wells, *Methods Enzymol.* **1997**, *289*, 298–313.
- [166] S. Atwell, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 9497–9502.
- [167] L. Chen, J. Cohen, X. Song, A. Zhao, Z. Ye, C. J. Feulner, P. Doonan, W. Somers, L. Lin, P. R. Chen, *Sci. Rep.* **2016**, 1–12.
- [168] L. Schmohl, J. Bierlmeier, F. Gerth, C. Freund, D. Schwarzer, *J. Pept. Sci.* **2017**, *23*, 631–635.
- [169] K. Piotukh, B. Geltinger, N. Heinrich, F. Gerth, M. Beyermann, C. Freund, D. Schwarzer, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17536–9.
- [170] B. M. Dorr, H. O. Ham, C. An, E. L. Chaikof, D. R. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 13343–13348.
- [171] L. Deweid, L. Neureiter, S. Englert, H. Schneider, J. Deweid, D. Yanakieva, J. Sturm,

- S. Bitsch, A. Christmann, O. Avrutina, H. L. Fuchsbauer, H. Kolmar, *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24*, 15195–15200.
- [172] L. Deweid, O. Avrutina, H. Kolmar, **2019**, pp. 151–169.
- [173] A. E. Ringel, A. M. Cieniewicz, S. D. Taverna, C. Wolberger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, E5461–E5470.
- [174] F. W. Studier, B. A. Moffatt, *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 113–130.
- [175] K. B. Mullis, F. A. Faloona, *Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction*, Elsevier, **1987**.
- [176] W. J. Dower, J. F. Miller, C. W. Ragsdale, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 6127–45.
- [177] J. Lin-Cereghino, W. W. Wong, S. Xiong, W. Giang, L. T. Luong, J. Vu, S. D. Johnson, G. P. Lin-Cereghino, *Biotechniques* **2005**, *38*, 44–48.
- [178] S. Gill, P. Von Hippel, *Anal Biochem.* **1989**, *1;182(2)*, 319–26.
- [179] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680–5.
- [180] M. V. Nesterenko, M. Tilley, S. J. Upton, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1994**, *28*, 239–242.
- [181] M. Paschke, W. Höhne, *Gene* **2005**, *350*, 79–88.
- [182] J. Pédelacq, S. Cabantous, T. Tran, *Nat. ...* **2005**, *24*, 79–88.
- [183] M. Paschke, G. Zahn, a. Warsinke, W. Höhne, *Biotechniques* **2001**, *30*, 720–726.
- [184] B. Virnekas, L. Ge, A. Pluëkthun, K. C. Schneider, G. Wellnhofer, S. E. Moroney, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 5600–5607.
- [185] M. L. Gerth, W. M. Patrick, S. Lutz, *Protein Eng. Des. Sel.* **2004**, *17*, 595–602.
- [186] a Skerra, *Gene* **1994**, *151*, 131–135.
- [187] M. Russel, P. Model, *J. Virol.* **1989**, *63*, 3284–95.
- [188] M. Russel, H. B. Lowman, T. Clackson, *Phage Display: A Practical Approach*, **2004**.
- [189] B. Jiang, W. Liu, H. Qu, L. Meng, S. Song, T. Ouyang, C. Shou, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4656–4662.
- [190] M. T. Naik, N. Suree, U. Ilangovan, C. K. Liew, W. Thieu, D. O. Campbell, J. J. Clemens, M. E. Jung, R. T. Clubb, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1817–26.
- [191] U. Ilangovan, H. Ton-That, *Proc. ...* **2001**, *98*, 6056–6061.
- [192] W. J. Bradshaw, A. H. Davies, C. J. Chambers, A. K. Roberts, C. C. Shone, K. R. Acharya, *FEBS J.* **2015**, *282*, 2097–114.
- [193] M. Paschke, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70*, 2–11.
- [194] G. Zahn, a Skerra, W. Höhne, *Protein Eng.* **1999**, *12*, 1031–1034.
- [195] L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, DOI 10.1021/cr000033x.
- [196] M. Takeda-Shitaka, K. Kamiya, T. Miyata, N. Ohkura, S. Madoiwa, Y. Sakata, H. Umeyama, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1999**, *47*, 322–8.
- [197] M. Takeda-Shitaka, H. Umeyama, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1998**, *46*, 1343–8.
- [198] M. Takeda-Shitaka, H. Umeyama, *FEBS Lett.* **1998**, *425*, 448–52.

- [199] A. Pasternak, X. Liu, T. Y. Lin, L. Hedstrom, *Biochemistry* **1998**, *37*, 16201–16210.
- [200] V. Schellenberger, C. W. Turck, L. Hedstrom, W. J. Rutter, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4349–4353.
- [201] V. Schellenberger, W. J. Rutter, C. W. Turck, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4251–4257.
- [202] A. Hoffmann, Erzeugung Und Charakterisierung Ubiquitin-Basierter Bindeproteine, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2011**.
- [203] C. Stordeur, Artificielle Bindeproteine Auf Der Basis Des Ultrastabilen Scaffold Proteins M7, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2013**.
- [204] W.-J. Chung, D.-Y. Lee, S. Y. Yoo, *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 5825–36.
- [205] P. Li, A. Anumanthan, X.-G. Gao, K. Ilangovan, V. V. Suzara, N. Düzgüneş, V. Renugopalakrishnan, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2007**, *142*, 105–124.
- [206] M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, H. Schwab, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 5301–5317.
- [207] J. J. Clare, M. A. Romanes, F. B. Rayment, J. E. Rowedder, M. A. Smith, M. M. Payne, K. Sreekrishna, C. A. Henwood, *Gene* **1991**, *105*, 205–212.
- [208] V. Schellenberger, C. W. Turck, W. J. Rutter, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4251–4257.
- [209] V. Schellenberger, C. W. Turck, L. Hedstrom, W. J. Rutter, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4349–4353.
- [210] A. Schellenberger, G. Fischer, G. Hübner, R. Ulbrich, *Enzymkatalyse*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **1989**.
- [211] W. A. Kreiner, *Entropie – Was Ist Das?*, Universitätsverlag Ulm GmbH, Ulm, **2013**.
- [212] R. Lundblad, F. Macdonald, Eds. , *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, CRC Press, **2010**.
- [213] C. Schmidt, Studien Zur Optimierung Einer Ausgewählten Trypsiligasevariante Zur Herstellung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2018**.
- [214] C. P. Guimaraes, M. D. Witte, C. S. Theile, G. Bozkurt, L. Kundrat, A. E. M. Blom, H. L. Ploegh, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1787–99.
- [215] B. M. Paterson, K. Alt, C. M. Jeffery, R. I. Price, S. Jagdale, S. Rigby, C. C. Williams, K. Peter, C. E. Hagemeyer, P. S. Donnelly, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 6115–9.
- [216] H.-J. Jeong, G. C. Abhiraman, C. M. Story, J. R. Ingram, S. K. Dougan, *PLoS One* **2017**, *12*, e0189068.
- [217] M. D. Lee, W. Y. Tong, T. Nebl, L. A. Pearce, T. M. Pham, A. Golbaz-Hagh, S. Puttick, S. Rose, T. E. Adams, C. C. Williams, *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 2539–2543.
- [218] R. Nahta, F. J. Esteva, *Cancer Lett.* **2006**, *232*, 123–138.
- [219] M. Schöpfel, A. Tziridis, U. Arnold, M. T. Stubbs, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1523–1527.
- [220] C. Yuan, L. Chen, E. J. Meehan, N. Daly, D. J. Craik, M. Huang, J. C. Ngo, *BMC Struct. Biol.* **2011**, *11*, 30.

- [221] B. S. Hartley, *Philos. Trans. R. Soc. London. B, Biol. Sci.* **1970**, 257, 77–87.
- [222] V. C. Damalanka, Z. Han, P. Karmakar, A. J. O’Donoghue, F. La Greca, T. Kim, S. M. Pant, J. Helander, J. Klefström, C. S. Craik, J. W. Janetka, *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 480–490.
- [223] J. M. Roßkopf, Improved Drug Delivery of Next- Generation Antibody-Drug Conjugates by Utilizing Tumor-Associated Proteases, Technische Universität Darmstadt, **2019**.
- [224] A. Schulze, Optimierung Der Trypsinligase Zur Modifizierung von Proteinen, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2015**.
- [225] J. Voigt, Studien Zur Enzymkinetischen Modifikation von Proteinen, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2016**.
- [226] C. Meyer, Kombination Chemischer Und Enzymatischer Methoden Zur Regiospezifischen Modifizierung von Proteinen, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2019**.

Anhang

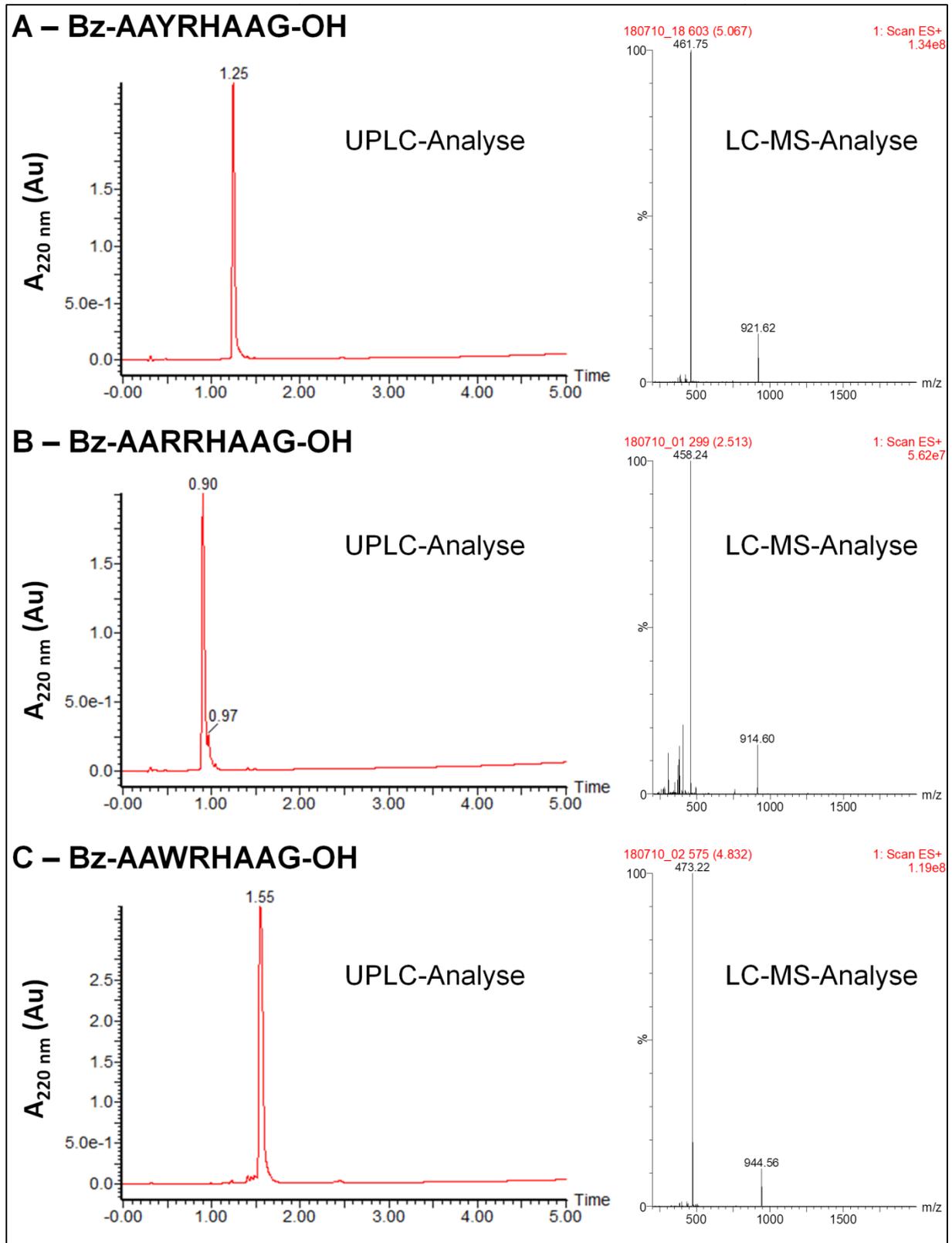


Abbildung A1: Untersuchung der Reinheit von Peptiden mittels UPLC und LC-MS-Analyse. A) Bz-AAYRHAAG-OH. B) Bz-AARRHAAG-OH. C) Bz-AAWRHAAG-OH.

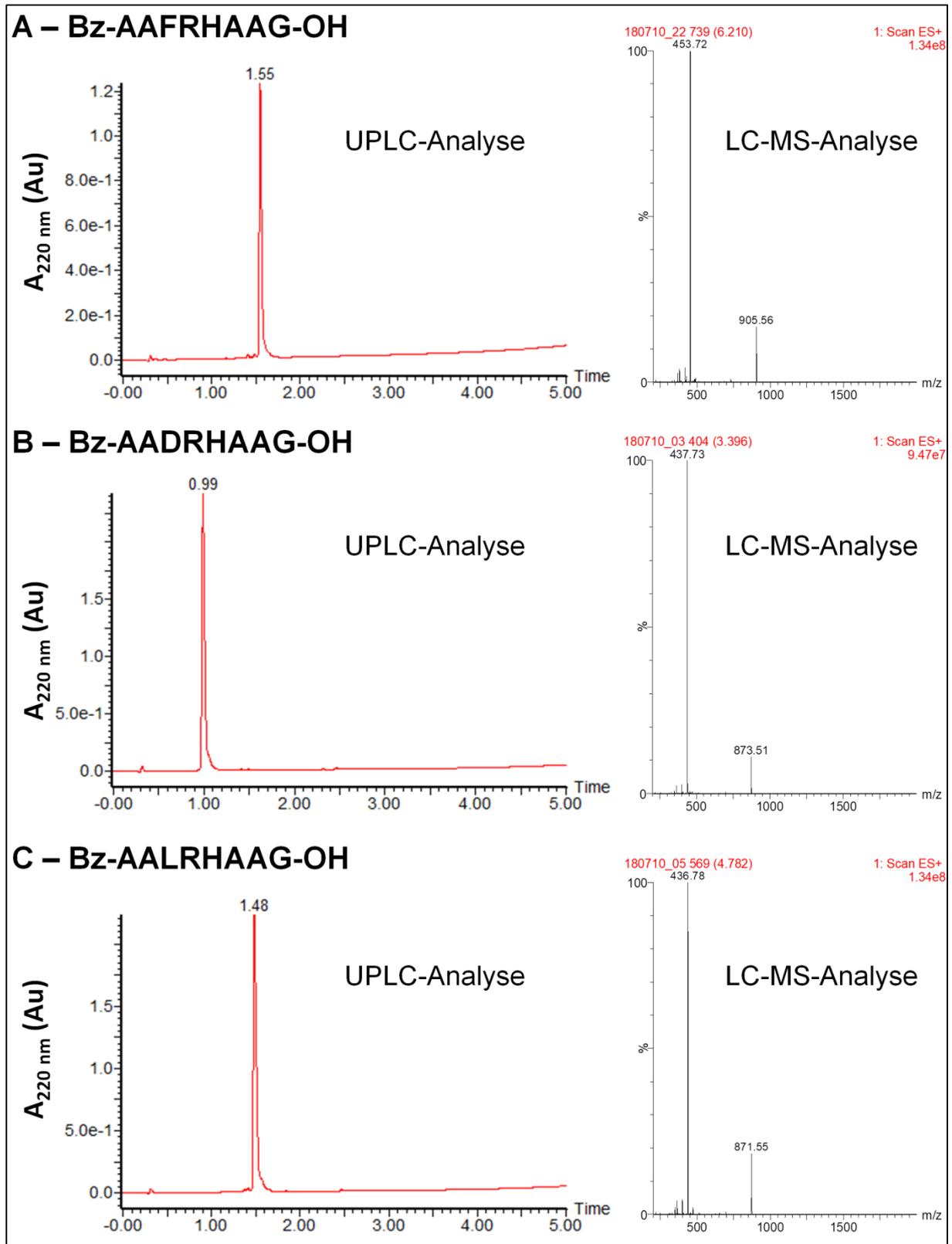


Abbildung A2: Untersuchung der Reinheit von Peptiden mittels UPLC und LC-MS-Analyse. A) Bz-AAFRHAAG-OH. B) Bz-AADRHAAG-OH. C) Bz-AALRHAAG-OH.

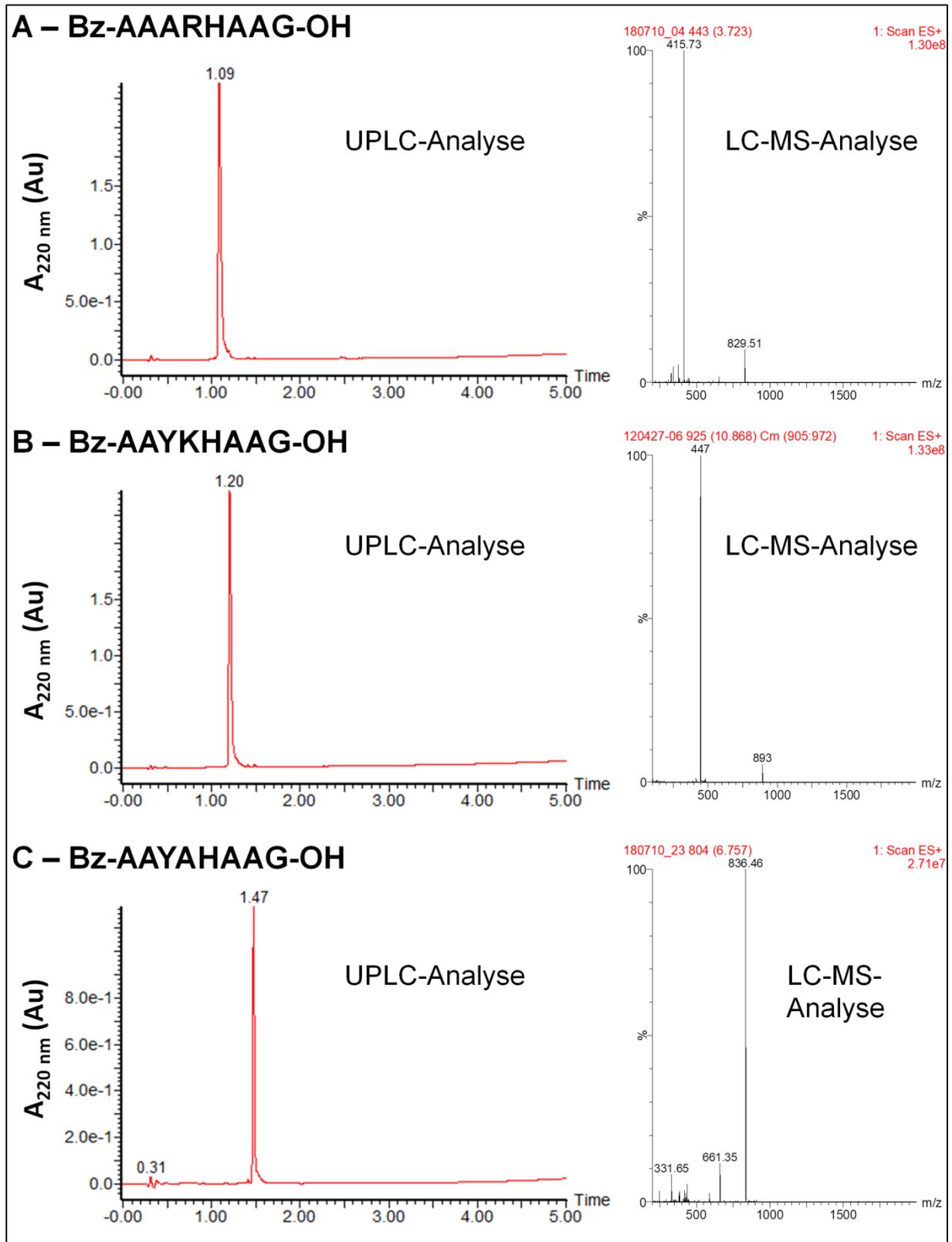


Abbildung A3: Untersuchung der Reinheit von Peptiden mittels UPLC und LC-MS-Analyse. A) Bz-AAARHAAG-OH. B) Bz-AAYKHAAG-OH. C) Bz-AAYAHAAG-OH.

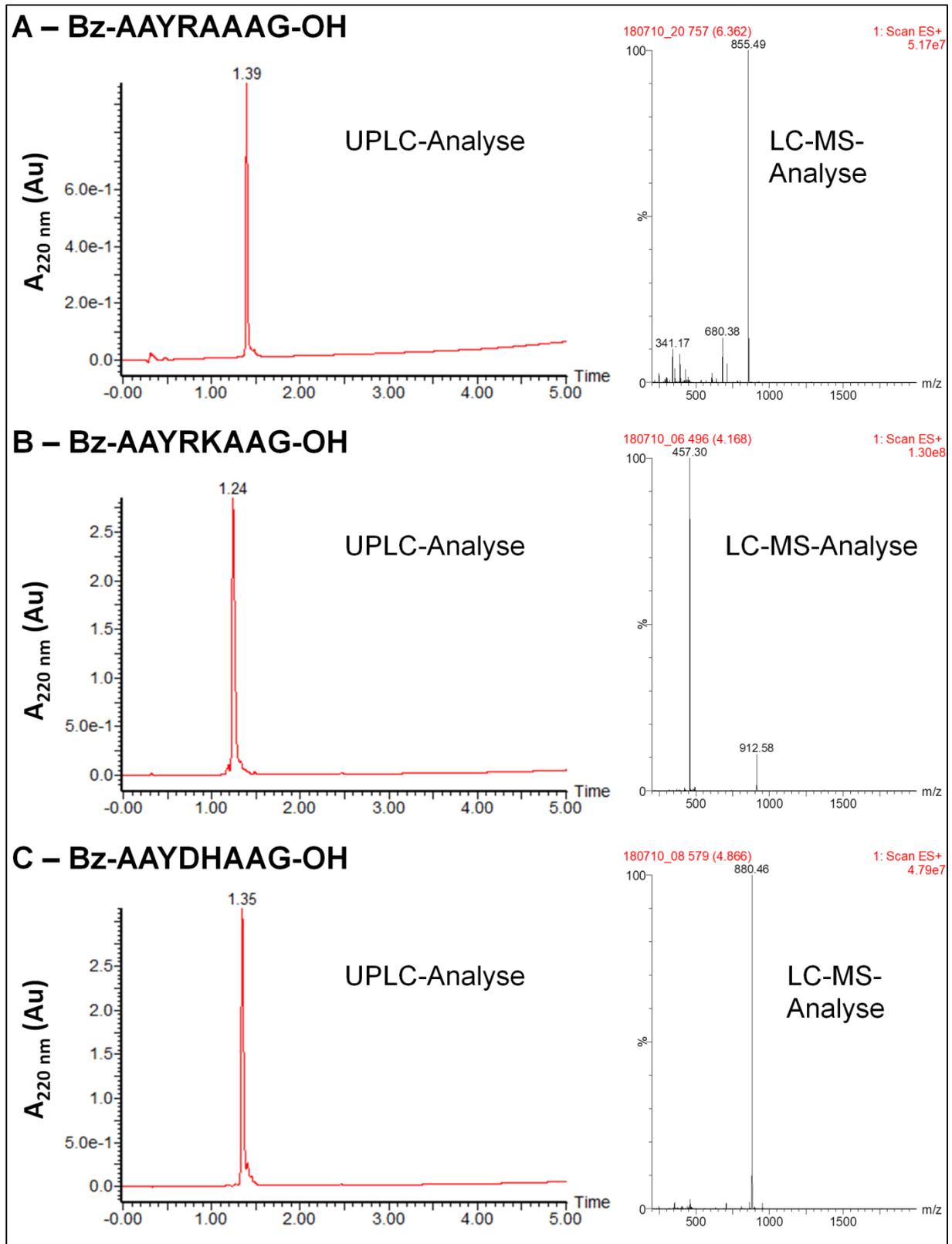


Abbildung A4: Untersuchung der Reinheit von Peptiden mittels UPLC und LC-MS-Analyse. A) Bz-AAYRAAG-OH. B) Bz-AAYRKAAG-OH. C) Bz-AAYDHAAG-OH.

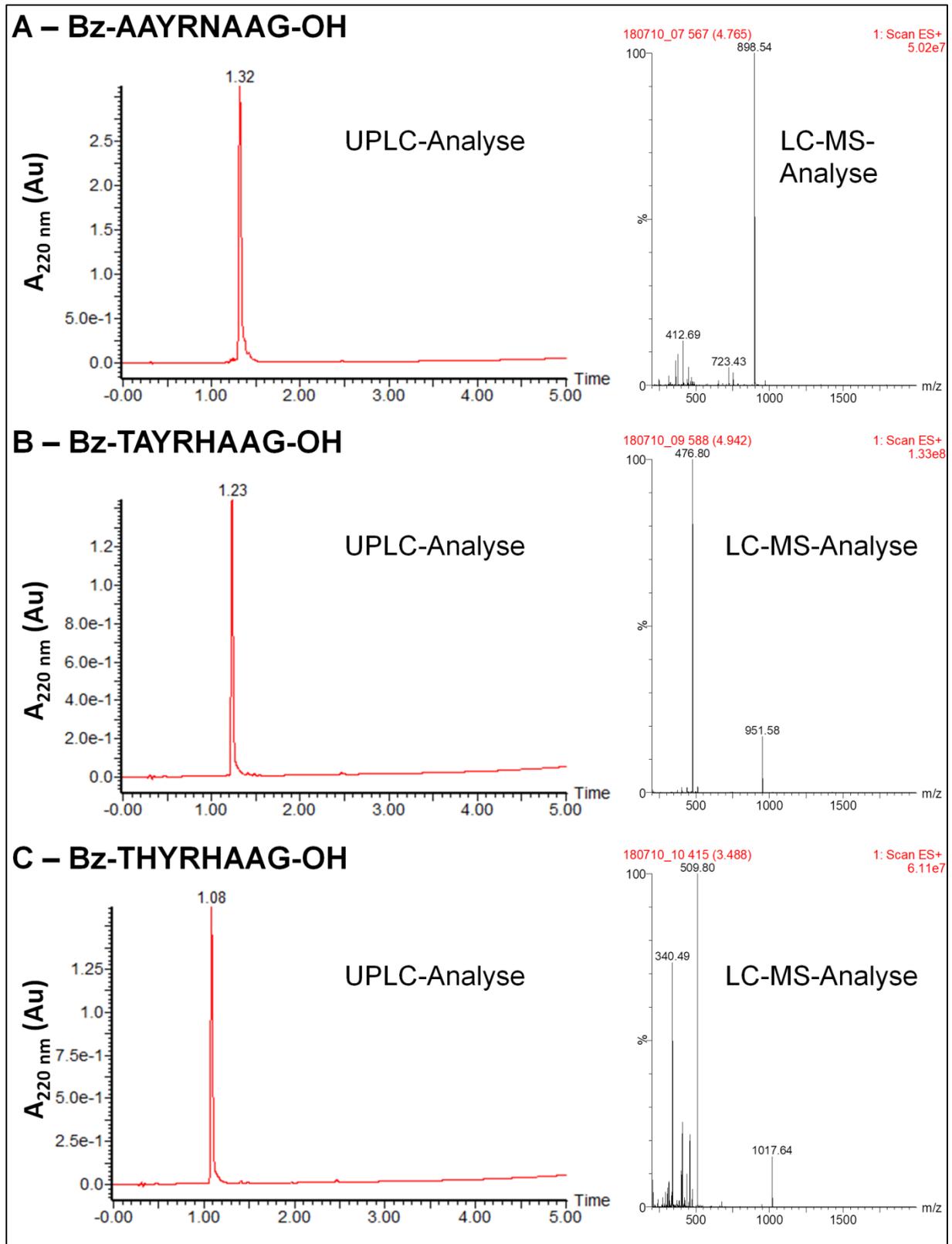


Abbildung A5: Untersuchung der Reinheit von Peptiden mittels UPLC und LC-MS-Analyse. A) Bz-AAYRNAAG-OH. B) Bz-TAYRHAAG-OH. C) Bz-THYRHAAG-OH.

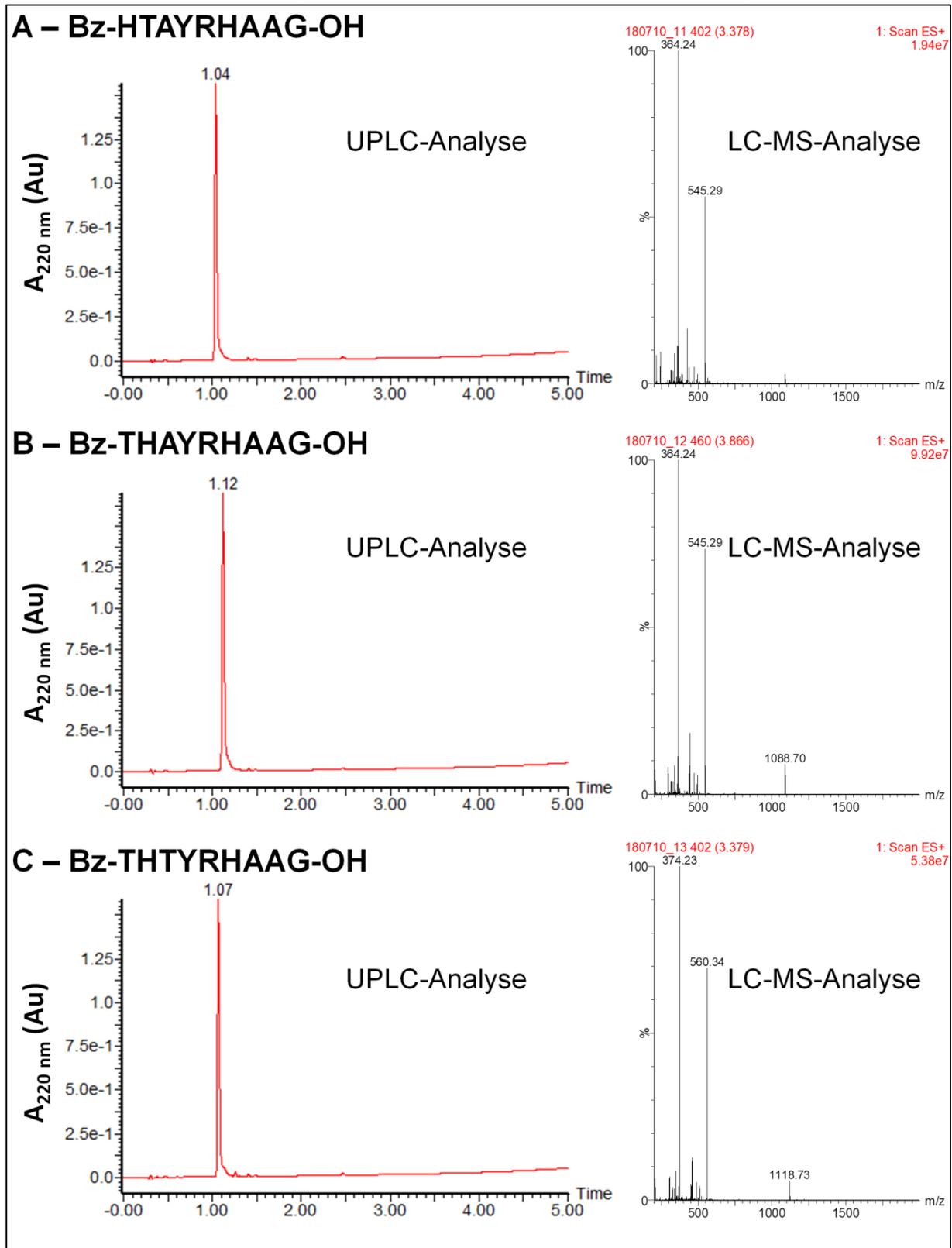


Abbildung A6: Untersuchung der Reinheit von Peptiden mittels UPLC und LC-MS-Analyse. A) Bz-HTAYRHAAG-OH. B) Bz-THAYRHAAG-OH. C) Bz-THTYRHAAG-OH.

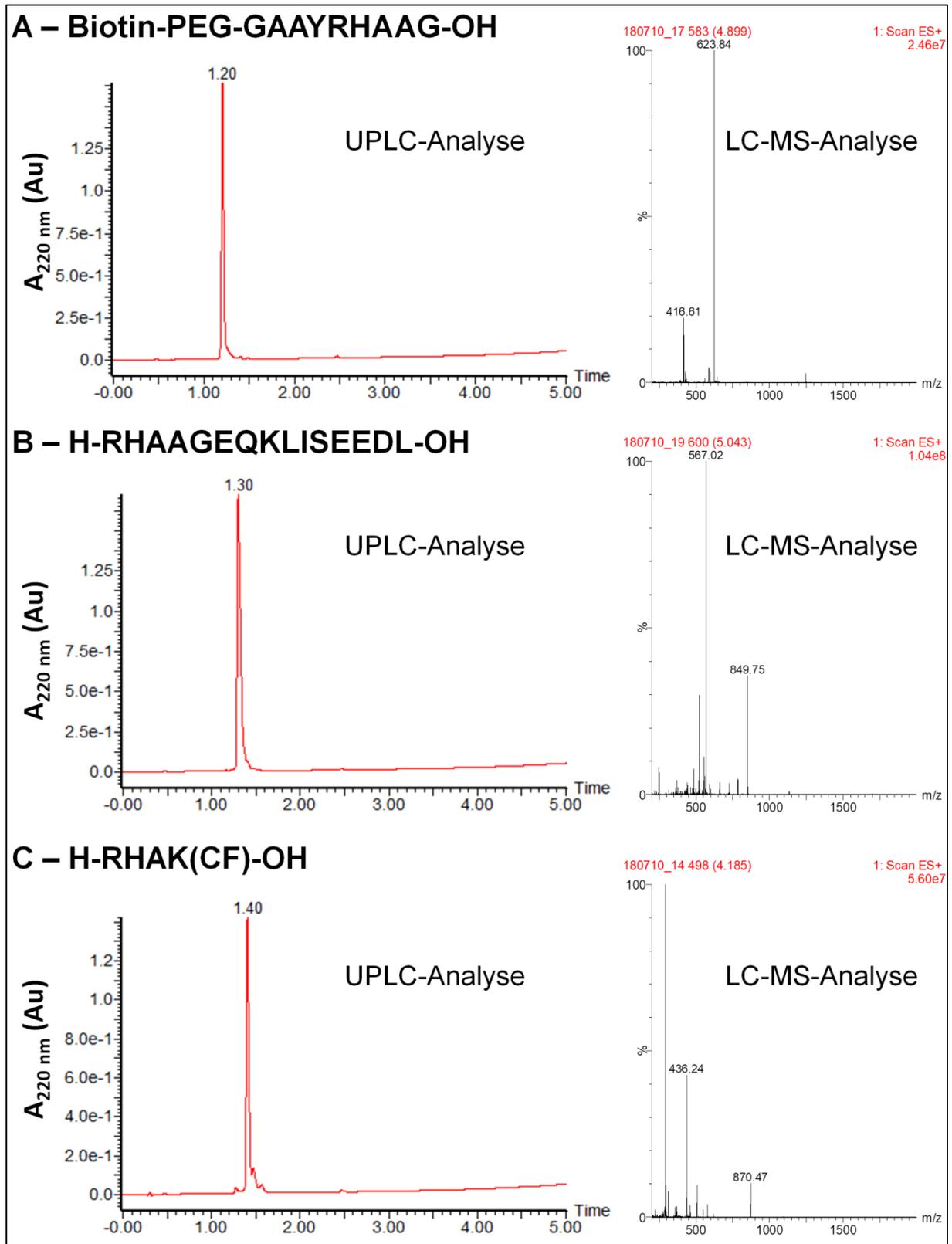


Abbildung A7: Untersuchung der Reinheit von Peptiden mittels UPLC und LC-MS-Analyse. A) Biotin-PEG-GAAYRHAAG-OH. B) H-RHAAGEQKLISEEDL-OH. C) H-RHAK(CF)-OH.

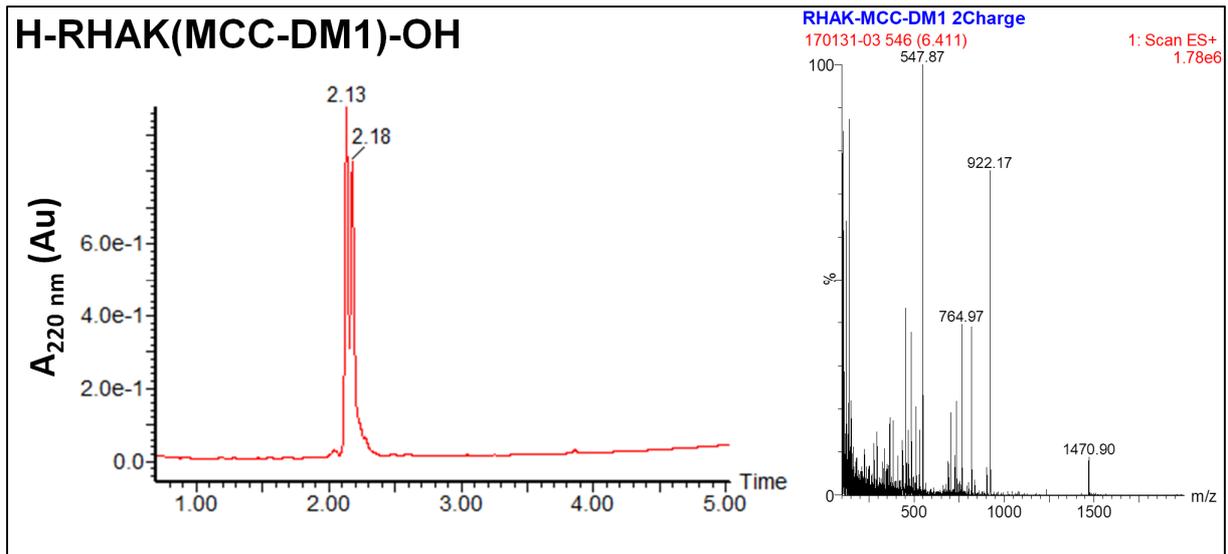


Abbildung A8: Untersuchung der Reinheit von Peptiden mittels UPLC und LC-MS-Analyse. H-RHAK(MCC-DM1)-OH.

```

1 attgttggtg gttatacctg tcaagaaaac agcgttccgt atcagggttag cctgaatagc ggttatcact
taacaaccac caatatggac agttcttttg tcgcaaggca tagtccaatc ggacttatcg ccaatagtga
H40
>>.....Trypsiligase K60E/N143H/E151H/D189K.....>
i v g g y t c q e n s v p y q v s l n s g y h

71 tttgttggtg tagcctgac aacgatcagt gggttggttag cgcaacacac tgttatgaaa gccgtattca
aaacaccacc atcggactag ttgctagtca cccaacaatc gcgtcgtgtg acaatacttt cggcataagt
A55 K60E
>.....Trypsiligase K60E/N143H/E151H/D189K.....>
f c g g s l i n d q w v v s a a h c y e s r i

141 ggttcgtctg ggtgaacaca atatcaatgt tctggaaggc aatgaacagt ttgtgaatgc agccaaaatc
ccaagcagac ccacttgtgt tatagttaca agaccttccg ttacttgtca aacacttaag tcggttttag
>.....Trypsiligase K60E/N143H/E151H/D189K.....>
q v r l g e h n i n v l e g n e q f v n a a k i

211 atcaaacacc cgaactttga tcgcaaaact ctgaacaacg atatcatgct gatcaaacctg agcagtcagg
tagtttgggg gcttgaaact agcgttttga gacttgtgtc tatagtagca ctagtttgac tcgtcaggcc
K97 L99
>.....Trypsiligase K60E/N143H/E151H/D189K.....>
i k h p n f d r k t l n n d i m l i k l s s p

281 ttaaactgaa tgcacgtgtt gcaaccggtg cactgcccag cagctgtgca ccggcaggca cccagtgtct
aatttgactt acgtgcacaa cgttggcaac gtgacggctc gtcgacacgt ggccgtccgt gggtcacaga
>.....Trypsiligase K60E/N143H/E151H/D189K.....>
v k l n a r v a t v a l p s s c a p a g t q c

351 gattagcggg tgggggtcata ccctgagcag cgggtgtaat catccggatc tgctgcagtg tctggatgca
ctaactgcca accccagtat gggactcgtc gccacaatta gtaggcctag acgacgtcac agacctacgt
N143H E151H
>.....Trypsiligase K60E/N143H/E151H/D189K.....>
l i s g w g h t l s s g v n h p d l l q c l d a

421 ccgctgctgc cgcaggcaga ttgtgaagca agctatcctg gcaaaatcac cgataaacatg gtttgtgtg
ggcgacgacg gcgtccgtct aacacttctg tcgataggac cgtttttagtg gctattgtac caaacacaac
>.....Trypsiligase K60E/N143H/E151H/D189K.....>
p l l p q a d c e a s y p g k i t d n m v c v

491 gttttctgga aggtggcaag aaaagctgtc aggggtgacag cgggtggtccg gttgtttgta atggtgaact
caaaagacct tccaccgttc ttttcgacag tcccactgtc gccaccaggc caacaaacat taccacttga
D189KS190 Q192
>.....Trypsiligase K60E/N143H/E151H/D189K.....>
g f l e g g k k s c q g d s g g p v v c n g e

561 gcagggtatc gtttagctggg gttatggttg tgcactgccg gataatccgg gtgtgtatac caaagttgt
cgccccatag caatcgacc caataccaac acgtgacggc ctattaggcc cacacatatg gtttcaaaca
>.....Trypsiligase K60E/N143H/E151H/D189K.....>
l q g i v s w g y g c a l p d n p g v y t k v c

631 aactatggtg attggattca ggacaccatt gcagccaac
ttgataaac taacctaat cctgtggtaa cgtcggttg
>..Trypsiligase K60E/N143H/E151H/D189K..>
n y v d w i q d t i a a n

```

Abbildung A9: Codon usage optimierte Gensequenz der Trypsinvariante Trypsiligase. Die vier Mutationen von Trypsiligase K60E/N143H/E151H/D189K sind in blau dargestellt. Die sechs Randomisierungspositionen für die Generierung der Trypsiligase-basierten Variantenbibliothek sind in rot dargestellt. Die korrespondierende Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode in grün dargestellt.

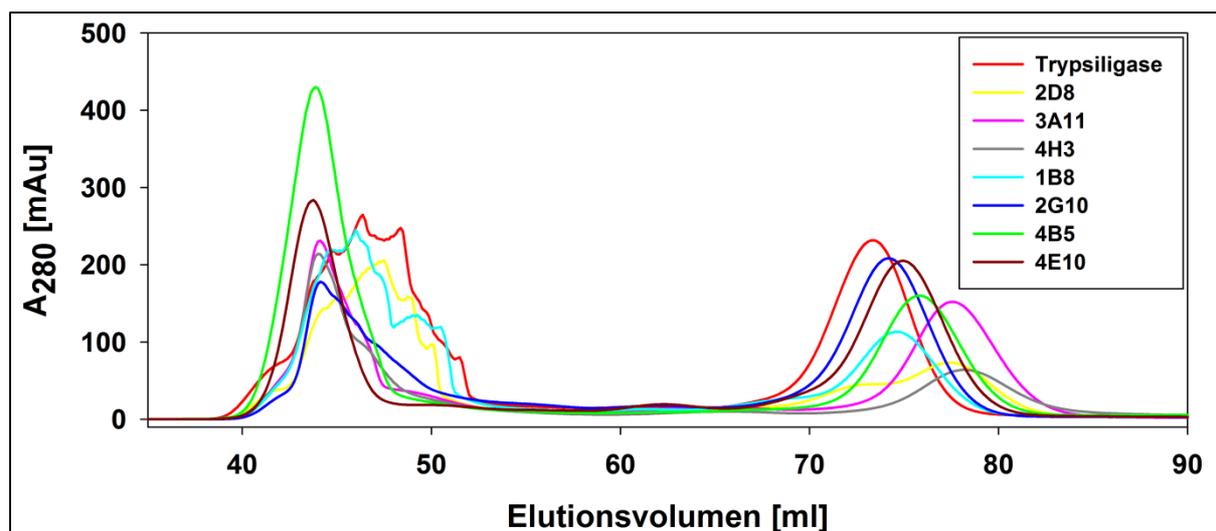


Abbildung A10: Chromatogramme des zweiten Reinigungsschrittes mittels Größenausschlusschromatographie für potentiell verbesserte Biokatalysatoren.

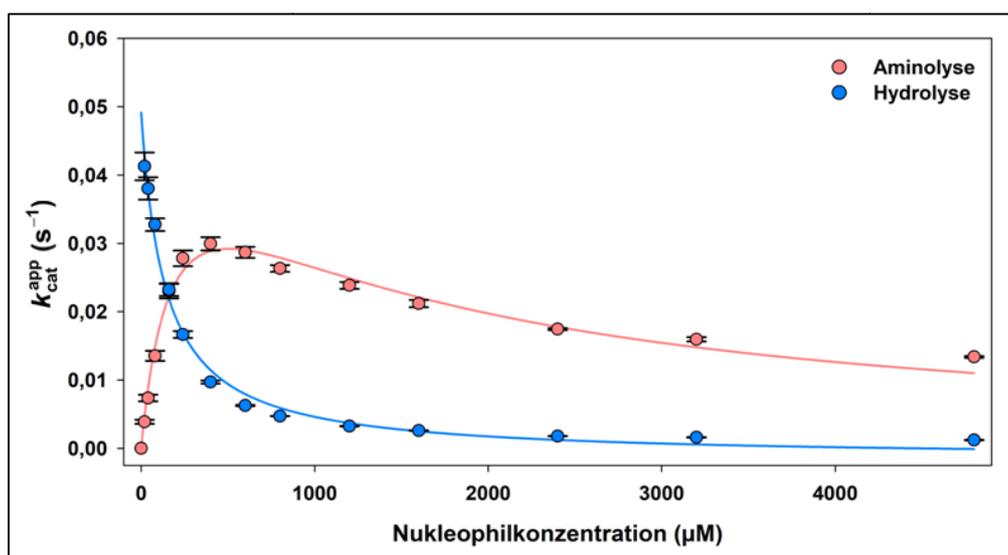


Abbildung A11: Graphische Auswertung zur Abhängigkeit der durch Trypsiligase katalysierten Transamidierungsreaktion von der Konzentration des peptidischen Nucleophils. Die Messung der apparenten Wechselzahlen für die Aminolyse- sowie Hydrolysereaktion erfolgte bei einer variierenden Nucleophilkonzentration von 0-4800 μM . Die erhaltenen Messwerte wurden als Funktion der Nucleophilkonzentration aufgetragen. Die nichtlineare Regressionsanalyse sowie die Ermittlung der enzymkinetischen Parameter erfolgten für die Aminolysereaktion mittels der Gleichungen 5-7 und für die Hydrolysereaktion mittels Gleichung 8. Die enzymkinetischen Parameter werden in Tabelle 27 zusammengefasst. Reaktionsbedingungen: 0,2 μM Trypsiligase, 80 μM Bz-AAYRHAAG-OH, 0-4800 μM H RHAH OH in 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 100 μM ZnCl_2 , pH 7,8 bei $T = 30^\circ\text{C}$. Alle aufgetragenen Wechselzahlen stellen den Mittelwert zweier unabhängig durchgeführten Messreihen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Anstiegs aus der Geradengleichung der linearen Regressionsanalyse.

Danksagung

Prof. Dr. Frank Bordusa danke ich für die Vergabe dieses spannenden und fordernden Themas sowie für sein Vertrauen, seine Diskussionsbereitschaft und die stete Unterstützung. Zudem möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich eine Vielzahl von Projekten in anwendungsorientierten, industrienahen Kooperationen bearbeiten konnte.

Dr. Sandra Liebscher danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, das stete Interesse und die Vielzahl an Ideen, welche zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Bianka Hartrodt, Steffanie Kaufmann, Karin Jentzsch und Dr. Christoph Meyer danke ich für die Synthese und Reinigung der in dieser Arbeit verwendeten Peptide.

Ein großer Dank gilt Johanna Voigt und Caroline Schmidt für Ihre erstklassigen Masterarbeiten sowie Alina Schulze für eine ebenfalls tolle Bachelorarbeit. Damit habt Ihr einen wertvollen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet und ich wünsche Euch viel Erfolg im Berufsleben.

Dr. Sven Pfeifer danke ich für die Unterstützung beim Design und der Konstruktion der Trypsiligasebasierten DNA-Bibliothek und für die Möglichkeit, die dazu gehörigen praktischen Arbeiten sowie das Hochdurchsatz-Screening in seinen Laboren durchführen zu dürfen.

Bei Dr. Dominik Schneider bedanke ich mich für die Einarbeitung am QPix2 und am Biomek FX sowie die zahlreichen Tipps bei der Durchführung des Hochdurchsatz-Screenings.

Prof. Dr. Ralph Golbik und PD Dr. Hauke Lilie danke ich für die fachliche Beratung und die hilfreichen „Denkanstöße“ bei diversen Fragestellungen.

René Wartner danke ich sehr für die tolle langjährige Zusammenarbeit und der gemeinsamen Bewältigung vieler Problemstellungen.

Der gesamten Arbeitsgruppe Bordusa danke für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie für die tolle Zeit während und außerhalb des Laboralltags.

Bei Dr. Thomas Richter, Prof. Dr. Ulrike Fiedler, René Wartner, Andreas Simon, Felix Dittrich, Dr. Christoph Meyer, Dr. Sandra Liebscher und Katja Göldner möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit im Rahmen des Kooperationsprojektes mit der BTI GmbH bedanken.

Danksagung

Dem Schwerpunktprogramm 1623 danke ich für die finanzielle Unterstützung sowie für die Möglichkeit an Doktoranden-*workshops* teilnehmen zu können.

Weiterhin möchte ich bei allen bedanken, die mich durch das intensive Korrekturlesen dieser Arbeit sehr unterstützt haben.

Bei meinen Freunden bedanke ich mich sehr für den Zusammenhalt sowie für die vielen schönen Momente abseits des Laboralltags.

Bei der Biochemiker-*retreat*-Truppe bedanke ich mich für die jährlichen Wochenendausflüge und den Zusammenhalt über die ganzen Jahre.

Bei der gesamten Squash-Truppe „Ralphs Lehrauftrag“ bedanke ich mich für die knallharten Duelle und die zahlreichen Lehrstunden zum Thema „aufstehen, wenn man mal am Boden liegt“.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für den überaus großen Rückhalt und die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Besonders danke ich meiner Frau Franziska und meinen zwei Söhnen Anton und Lukas für die Geduld, das Verständnis und die Kraft, die Ihr mir jeden Tag aufs Neue gebt.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Familienname	Böhme
Vorname	Marcus
Vorhandener akademischer Grad	Diplom-Biochemiker
Geburtsdatum/-ort	21.07.1985 in Leipzig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung und beruflicher Werdegang

03.2020 – heute	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Gründungsprojekt „TrypCo“ an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Förderung durch das Land Sachsen-Anhalt und durch die Europäische Union im Rahmen des ego.-Gründungstransfers
03.2016 – 02.2020	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der BioPharma Translationsinstitut Dessau Forschungs GmbH
03.2012 – 02.2016	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abteilung Naturstoffbiochemie, Anfertigung der Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Frank Bordusa zum Thema „ <i>Optimierung von Trypsilgase zur C-terminalen Modifikation von Proteinen</i> “
12.2011 – 03.2012	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abteilung Technische Biochemie
10.2006 – 10.2011	Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss: Diplom, Anfertigung der Diplomarbeit „Selektion M7-basierter künstlicher Bindeproteine mittels <i>ribosome display</i> “ in der Nachwuchsgruppe „Künstliche Bindeproteine“ unter Anleitung von Dr. Sven Pfeifer
08.2004 – 08.2006	Ausbildung zum Technischen Assistenten für chemische und biologische Laboratorien, Bernd-Blindow-Berufsfachschule, Leipzig
1997 – 2004	Allgemeine Hochschulreife, Anton-Philipp-Reclam-Gymnasium, Leipzig

Publikationsliste

Patent

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

Erfinder: **R. Wartner, M. Boehme, F. Bordusa, A.H. Simon, T. Richter**

Internationales Anmeldedatum: 19. Dezember 2019; Veröffentlichungstag: 25. Juni 2020;

Anmelder: BioPharma Translationsinstitut Dessau Forschungs GmbH

Tagungsbeiträge – Vorträge

”TrypCo[®] Technology - A versatile enzymatic tool for site-specific generation of ADCs”.
9th World ADC London, 04.-06.03.2019, London, Vereinigtes Königreich

“Semisynthesis of antibody drug conjugates via biocatalysis”. 3. Berichtstreffen SPP1623,
21.-22.11.2016, München, Deutschland

“Semisynthesis of antibody drug conjugates via biocatalysis”. 2. Berichtstreffen SPP1623,
13.-14.11.2014, Frankfurt am Main, Deutschland

“Semisynthesis of antibody drug conjugates via biocatalysis”. Bioorthogonal Chemistry con-
gress - Meeting of the Biochemistry Division, 16.-18.07.2014, Berlin, Deutschland

“Semisynthesis of antibody drug conjugates via biocatalysis”. 1. Berichtstreffen SPP1623,
03.-05.07.2013, Dortmund, Deutschland

Tagungsbeiträge – Poster

R. Wartner, M. Böhme, A. H. Simon, C. Meyer, F. Dittrich, S. Liebscher, F. Bordusa (2019). TrypCo[®] Technology - A versatile enzymatic tool for site-specific generation of ADCs. 11th Annual PEGS Europe, 19.-22.11.2019, Lissabon, Portugal

A. H. Simon, M. Böhme, R. Wartner, C. Meyer, F. Dittrich, S. Liebscher, F. Bordusa (2019). *TrypCo® Technology - A versatile enzymatic tool for site-specific generation of ADCs.* 10th World ADC San Diego, 08.-11.10.2019, San Diego, USA

R. Wartner, M. Böhme, A. H. Simon, C. Meyer, F. Dittrich, S. Liebscher, F. Bordusa (2019). *TrypCo® Technology - A versatile enzymatic tool for site-specific generation of ADCs.* 15th Annual PEGS BOSTON, 08.-12.04.2019, Boston, USA

M. Böhme, R. Wartner, A. H. Simon, C. Meyer, F. Dittrich, S. Liebscher, F. Bordusa (2019). *TrypCo® Technology - A versatile enzymatic tool for site-specific generation of ADCs.* 9th World ADC London, 04.-06.03.2019, London, Vereinigtes Königreich

M. Böhme, R. Wartner, A. H. Simon, C. Meyer, F. Dittrich, S. Liebscher, F. Bordusa (2018). *TrypCo® Technology - A versatile enzymatic tool for site-specific generation of ADCs.* 10th Annual PEGS Europe, 12.-16.11.2018, Lissabon, Portugal

S. Liebscher, P. Kornberger, G. Fink, EM. Trost-Gross, E. Hoess, M. Böhme, A. Skerra, F. Bordusa (2014). *Semisynthesis of antibody drug conjugates via biocatalysis.* Bioorthogonal Chemistry congress - Meeting of the Biochemistry Division, 16.-18.07.2014, Berlin, Deutschland

Eidesstattliche Erklärung

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

Halle, den 02.12.2020

Marcus Böhme