

D-Aminosäure-spezifische Proteasen und native All-L-Proteine: eine zweckmäßige Kombination für die Semisynthese**

Nicole Wehofskey, Andreas Pech, Sandra Liebscher, Stephanie Schmidt, Hidenobu Komeda, Yasuhisa Asano und Frank Bordusa*

Nach ihrer erfolgreichen Anwendung im Enzym-, Medium- und Substrat-Engineering haben Proteasen auch Bedeutung als regio- und stereospezifische Katalysatoren in der organischen Synthese erlangt.^[1] Speziell für Anwendungen, die auf ihrer nativen Hydrolyseaktivität beruhen, werden sie mittlerweile oft genutzt. Prinzipiell können die gleichen Optimierungsansätze auch ihre oftmals restriktive Substratspezifität erweitern und unerwünschte proteolytische Spaltungsreaktionen minimieren, die einer reversen Anwendung von Proteasen für die Peptidsynthese entgegenstehen.^[2] So gelang mithilfe dieser Optimierungstechniken die proteasekatalysierte Synthese von kurzen Peptiden,^[3] aber auch von längeren Oligopeptiden^[4] und Proteinen,^[5] durch enzymatische Fragmentligation. Ein breiter Einsatz dieser Strategie für die Proteinsynthese wird aber insbesondere durch die Protease selbst erschwert. Während das Spezifitätsproblem durch die Entwicklung der Substratmimetika-Strategie gelöst werden konnte,^[1] stellt die unerwünschte Proteolyseaktivität während der Ligationsreaktion nach wie vor eine praktische Einschränkung dar.

Hier berichten wir über die erste Verwendung von D-Aminosäure-spezifischen Proteasen in der Synthese von vollständig aus L-Aminosäuren aufgebauten Peptiden und Proteinen. Im Unterschied zu klassischen Proteasereaktionen, bei denen ausschließlich L-Aminosäure-spezifische Enzyme eingesetzt wurden, treten wegen der inhärenten Spezifität für D-Aminosäuren keinerlei proteolytische Nebenreaktionen an den aus L-Aminosäuren aufgebauten Re-

aktanten und Produkten auf. Die Motivation für die Verwendung dieser Enzyme beruht auf unseren früheren Befunden, wonach ironischerweise L-Proteasen die deutlich besseren Katalysatoren für die Synthese von All-D-Peptiden sind.^[6] Die Akzeptanz ursprünglich unspezifischer All-L-Peptiddonoren durch die D-Aminosäure-spezifische Protease wird hierbei wie im vorgenannten Verfahren durch die Verwendung von Substratmimetika als Acyldonorkomponente erreicht. Die Kombination derartiger Substratmimetika mit D-Proteasen ermöglicht letztlich die Synthese von All-L-Peptiden und sogar von nativen Enzymen (Abbildung 1) –

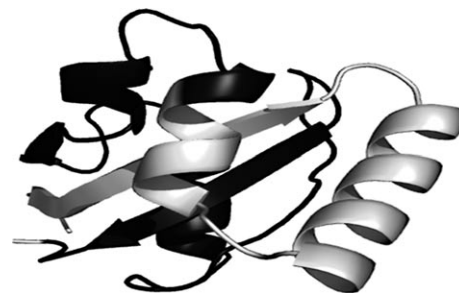


Abbildung 1. 3D-Struktur von *E. coli*-Par10.^[7] Die für die ADP-Synthese verwendeten N- und C-terminalen Peptidfragmente sind weiß (Par10-1–35) und schwarz (Par10-36–92) gekennzeichnet.

zwei Verbindungsklassen, für die D-Proteasen ursprünglich gänzlich unspezifisch sind. Milde Reaktionsbedingungen, die Verwendbarkeit von Peptidreaktanten mit ungeschützten Seitenketten und eine hohe Flexibilität bezüglich der Sequenz an der Ligationsstelle sind weitere Charakteristika dieser Methode, die zudem prinzipiell ohne organische Lösungsmittel oder künstliche Enzymvarianten auskommt.

Von entscheidender Bedeutung war zunächst die Identifizierung einer geeigneten D-Protease. Derzeit sind nur wenige mikrobielle Enzyme dieser Art bekannt, und die meisten davon sind wiederum Exoproteasen (z.B. die D-Amino-peptidase oder Carboxypeptidase DD).^[8] Aus den verbleibenden Vertretern mit der für Peptidligationen notwendigen Exopeptidaseaktivität wurde die „Alkaline D-Peptidase“ (ADP) aus *Bacillus cereus* ausgewählt, die aus eigenen Studien bereits als D-Phe-spezifische Protease bekannt war.^[9] Da ADP zudem auch eine Serinprotease ist, kann sie für die kinetisch kontrollierte Synthese eingesetzt werden, die sich wiederum mit dem Substratmimetika-Konzept kombinieren lässt.^[1] ADP selbst kann leicht rekombinant hergestellt werden, wobei sich für eine effiziente Isolierung des Enzyms eine C-terminale His₆-tag-Fusion anbietet.

[*] S. Liebscher, Prof. Dr. F. Bordusa
Institut für Biochemie/Biotechnologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Kurt-Mothes-Straße 3, 06120 Halle/Saale (Deutschland)
Fax: (+49) 345-551-1972
E-Mail: bordusa@enzyme-halle.mpg.de

Dr. N. Wehofskey, A. Pech, S. Schmidt
Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung
06120 Halle/Saale (Deutschland)

Dr. H. Komeda, Prof. Dr. Y. Asano
Biotechnology Research Center
Toyama Prefectural University
5180 Kurokawa, Kosugi, Toyama 939-0398 (Japan)

[**] Wir danken für die Unterstützung durch die DFG (SFB 610, SPP1170), Prof. G. Fischer für wt-Par10, S. Kaufmann für technische Assistenz sowie Dr. A. Schierhorn, C. Gersching, Dr. M. Liebscher und Dr. C. Mrestani-Claus für die Aufnahme der Massen-, CD- und NMR-Spektren.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

tet. Auf diese Weise konnte ADP mit einer spezifischen Aktivität von 5.3 U mg^{-1} erhalten werden (siehe die Hintergrundinformationen).

Die generelle Akzeptanz von Substratmimetika durch ADP wurde nachfolgend mit sieben ausgewählten Esterderivaten untersucht, die anhand ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum spezifischen D-Phe-Rest ausgewählt wurden. Gezielte Ansätze sind derzeit nicht möglich, weil die 3D-Struktur noch nicht aufgeklärt werden konnte. Hinweise wurden lediglich aus Studien mit Chymotrypsin erhalten, deren Relevanz auf der „gespiegelten“ Spezifität des Enzyms für L-Phe beruhen könnte. Für Chymotrypsin zeigte sich, dass Substitutionen am Phenylring hauptsächlich wegen zusätzlicher Wasserstoffbrücken zu einer höheren Spezifität führen.^[10] Daher wurden neben Benzyl- und Phenylestern auch Derivate wie die 4-Carboxyphenyl-, 4-Carboxamidophenyl-, (4-Hydroxyphenyl)sulfanyl-, 2-Carboxy-1*H*-indol-5-yl-, und insbesondere die 4-Guanidinophenyl-Ester, deren Akzeptanz bereits für Chymotrypsin gezeigt wurde,^[10] für ADP verwendet (siehe die Hintergrundinformationen). Der Acylrest wurde mit Boc-L-Alanin ADP-unspezifisch gewählt.

Nach der Synthese der entsprechenden Boc-L-Ala-O/SR-Ester wurde deren Akzeptanz durch ADP in Hydrolysestudien nachgewiesen, bei denen Boc-L-Ala-OMe mit einer unspezifischen Estergruppe als Kontrolle mitgeführt wurde. Alle aromatischen Ester wurden dabei von ADP umgesetzt (siehe die Hintergrundinformationen). Erstaunlicherweise wichen die Reaktionsgeschwindigkeiten trotz der unterschiedlichen Esterstrukturen mit einem Faktor von maximal drei nur sehr wenig voneinander ab, wobei der (4-Hydroxyphenyl)sulfanyl- bzw. Phenylester am langsamsten und der Benzyl- und 4-Guanidinophenylester am schnellsten hydrolysiert wurden. Trotz dieser vermeintlich großen Substratbreite von ADP erfolgte keine Hydrolyse von Boc-L-Ala-OMe mit seiner unspezifischen Methylesterfunktion, ein Befund, der die Notwendigkeit der aromatischen Esterabgangsgruppe der Substratmimetika für deren Erkennung durch ADP belegt. Weitere Studien unter Verwendung der leicht bevorzugten Boc-Xaa-OGp-Ester zeigten, dass der Effekt der OGp-Gruppe nicht auf L-Ala beschränkt ist. So

konnte für alle eingesetzten Boc-Xaa-OGp-Ester (Xaa = L-Glu, L-Lys, L-Gln, L-Leu, Gly, L-Phe) eine ADP-Akzeptanz nachgewiesen werden, die sich sogar auf das achirale Gly wie auch L-Phe als Enantiomer zum ursprünglich spezifischen D-Phe erstreckt. Bemerkenswert war zudem, dass der spezifischste Ester Boc-Gly-OGp nur 12-fach langsamer reagierte als das Standardsubstrat Ac-D-Phe-OMe ($v = 52 \text{ min}^{-1}$ bzw. 629 min^{-1}).

Die Eignung von ADP zur Verknüpfung von L-Aminosäure-Derivaten als Reaktanten wurde durch Modellreaktionen von spezifischen OGp-Estern als Acyldonoren und zwölf Aminosäureamiden als Acylakzeptoren untersucht. Um eine leistungsfähige HPLC-Analyse zu ermöglichen, wurden statt der N^α-Boc-substituierten Ester analoge N^α-Bz-geschützte OGp-Ester verwendet. Zu Vergleichszwecken wurde weiterhin das Standardsubstrat Ac-D-Phe-OMe eingesetzt. Zur Beurteilung einer spontanen Hydrolyse oder Aminolyse wurden zusätzlich Reaktionen ohne ADP analysiert. In diesen Reaktionen war keinerlei nichtenzymatische Aminolyse zu beobachten, und die Esterhydrolyserate betrug weniger als 5 %. Die Ergebnisse der ADP-vermittelten Reaktionen verdeutlichen, dass neben einem raschen Esterumsatz innerhalb von weniger als 15 min in allen Fällen die erwarteten Dipeptidprodukte gebildet wurden (Tabelle 1). Da dies auch für die Bz-L-Xaa-OGp-Ester gilt, kann man schließen, dass D-Proteasen in Kombination mit Substratmimetika zur Synthese von All-L-Peptiden befähigt sind; unseres Wissens hat dieser Befund absoluten Neuheitswert. Bei einer Analyse der Ausbeuten lässt sich jedoch ein Einfluss des Acyldonors und des Acylakzeptors feststellen. Generell spiegelt der Einfluss des Acylakzeptors die individuelle S'-Substratspezifität von ADP wider. Entsprechend bevorzugt dieses Enzym große und hydrophobe aliphatische und aromatische Aminosäuren in der S₁'-Position, während kleinere Reste sowie polare und insbesondere negativ geladene Aminosäureseitenketten weniger gut eingebunden werden. Obgleich dieser Trend qualitativ für alle Acyldonoren gilt, liegen die absoluten Ausbeuten mit bis zu 93 % bei den OGp-Estern deutlich über denen des Standardsubstrats. Diese Ausbeutesteigerung durch Substratmimetika konnte bereits

Tabelle 1: Ausbeuten [%] für die Synthese von All-L-Dipeptiden aus von L-Aminosäuren abgeleiteten 4-Guanidinophenylestern und dem Standardsubstrat Ac-D-Phe-OMe, katalysiert durch die „Alkaline D-Peptidase“.^[a]

Acylakzeptor	Acyldonor						
	Ac-D-Phe-OMe ^[b]	Bz-L-Phe-OGp ^[a]	Bz-L-Ala-OGp ^[c]	Bz-L-Leu-OGp ^[c]	Bz-L-Lys-OGp ^[d]	Bz-Gly-OGp ^[e]	Bz-L-Glu-OGp ^[d]
H-L-Pro-NH ₂	0.46	4.51	3.75	5.26	6.03	9.73	10.8
H-L-Glu-NH ₂	2.45	24.9	15.6	23.6	26.5	35.4	37.4
H-L-Ser-NH ₂	3.5	26.2	16.4	28.5	31.6	41.1	45.7
H-L-Ala-NH ₂	12.5	39.7	30.5	37.6	42.4	59.8	63.7
H-Gly-NH ₂	15.7	38.8	34.1	37.9	57.9	62.8	64.6
H-L-Lys-NH ₂	15.1	33.9	30.6	50.9	61.8	69.1	72.4
H-L-Val-NH ₂	28.7	35.0	49.7	51.8	65.9	82.2	83.7
H-L-Arg-NH ₂	29.2	43.0	60.3	65.6	73.1	84.3	87.2
H-L-Ile-NH ₂	35.4	45.7	69.9	71.4	77.1	88.1	89.8
H-L-Phe-NH ₂	43.0	55.1	78.7	78.2	80.3	89.6	90.9
H-L-Leu-NH ₂	47.1	57.6	75.1	83.2	80.9	92.3	91.6
H-L-Met-NH ₂	51.4	65.4	82.6	83.3	84.7	91.7	93.1

[a] Bedingungen: 30 °C, 0,1 M HEPES-Puffer pH 8,0, 10 Vol.-% DMF, [Acyldonor] = 2 mM, [Acylakzeptor] = 20 mM, [Enzym]: [b] 0,27 μM, [c] 43,6 μM, [d] 21,8 μM, [e] 2,22 μM. Reaktionszeit: 15 min. Fehler < 5 % (± 2,5 %).

in früheren Studien beobachtet werden.^[6] Der Effekt selbst zeigt jedoch eine Abhängigkeit von der Aminosäure im entsprechenden OGP-Ester. Mit Ausnahme der kleinen Gly- oder L-Ala-Reste scheint dieser Effekt umgekehrt proportional zur Enzymspezifität gegenüber dem jeweiligen Ester zu sein. So wird der von L-Glu abgeleitete OGP-Ester zwar am langsamsten hydrolysiert, er ist aber am effizientesten in der Synthese. Umgekehrt wird der L-Phe-Ester zwar rasch umgesetzt, aber am wenigsten effizient verknüpft. Doch selbst in diesem Fall sind die Ausbeuten mit spezifischen Acylakzeptoren noch für Synthesen nützlich.

Nachdem die Akzeptanz von kleinen Aminosäure-Derivaten als Reaktanten nachgewiesen werden konnte, wurde die Eignung von ADP zur Verknüpfung längerer Peptide untersucht. Hierzu wurden Reaktionen ausgehend von OGP-Estern mit 1, 3 und 10 Aminosäureresten und Acylakzeptoren mit 1, 10 und 16 Aminosäurebausteinen ausgeführt. Um Sekundäreffekte zu vermeiden, wurde die Sequenz an der Ligationsstelle festgelegt. Die Reaktionen wurden unter analogen Bedingungen wie bereits beschrieben ausgeführt, wobei lediglich die Acylakzeptorkonzentration von 20 auf 10 mM gesenkt wurde. Während in den Kontrollreaktionen erwartungsgemäß keine Umsätze festgestellt wurden, verliefen die ADP-vermittelten Reaktionen innerhalb von 15 min unter Bildung der gewünschten Produkte (Tabelle 2). Die geringere

Tabelle 2: Ausbeuten für die Ligation verlängerter All-L-Peptidfragmente, katalysiert durch „Alkaline D-Peptidase“.^[a]

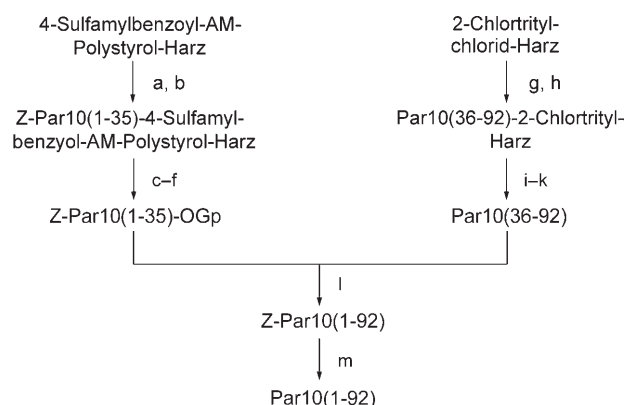
Acyldonor	Acylakzeptor	Ausbeute [%]
Bz-Gly-OGP	H-L-Leu-NH ₂	86.1
	H-LGSVKASAYK-OH	77.5
	H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH	83.2
Bz-Phe-Gly-Gly-OGP	H-L-Leu-NH ₂	54.0
	H-LGSVKASAYK-OH	45.6
	H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH	49.0
Bz-AYLDAYVKAG-OGP	H-L-Leu-NH ₂	46.9
	H-LGSVKASAYK-OH	40.1
	H-LIVDAVLEPVKAAGAY-OH	43.1

[a] Bedingungen: 30 °C, 0.1 M HEPES-Puffer pH 8.0, 10 Vol.-% DMF, [Acyldonor] = 2 mM, [Acylakzeptor] = 10 mM, [Enzym] = (5.5–8.7) × 10^{−6} M. Reaktionszeit: 15 min. Fehler: < 5 % (± 2.5 %).

Ausbeute bei der Reaktion von Bz-Gly-OGP mit H-L-Leu-NH₂ (vergleiche Tabelle 1) resultiert dabei aus der niedrigeren Acylakzeptorkonzentration. Wenn man diesen Effekt berücksichtigt, verringert eine Verlängerung des Acylakzeptors die Ausbeute nur wenig. Analoges zeigt sich für die Reaktionen mit den zusätzlich verlängerten Substratmimetika. Eine Akzeptanz noch längerer Acylakzeptorpeptide kann folglich vermutet werden. Etwas ausgeprägter ist dagegen der Effekt der Kettenlänge des Acyldonors. So sinkt die Ausbeute bei der Verlängerung von Bz-Gly-OGP zu Bz-Phe-Gly-Gly-OGP unabhängig von der Größe des Acylakzeptors um ca. 30 %. Eine weitere Kettenverlängerung, wie im Beispiel von Bz-AYLDAYVKAG-OGP gezeigt, verringert die Ausbeute dagegen nicht mehr, sodass ADP vermutlich auch noch längere Substratmimetika akzeptiert. Es sei angemerkt, dass abgesehen von hydrolysiertem Peptidester auch bei längeren

Reaktionszeiten (bis 24 h) grundsätzlich keine weiteren Nebenprodukte detektiert wurden. Unerwünschte Spaltungen können folglich ausgeschlossen werden (siehe die Hintergrundinformationen).

Abschließend wurde die Eignung von ADP zur Synthese nativer Proteine am Beispiel der Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase (PPIase) Parvulin 10 aus *E. coli* (Par10) untersucht. PPIasen beschleunigen im Allgemeinen *cis-trans*-Isomerisierungen von Xaa-Pro-Bindungen und beeinflussen die Faltung neu synthetisierter Proteine, den Zellzyklus sowie das Immunsystem in höher entwickelten Organismen.^[11] Entsprechend Schema 1 erfolgte die Synthese von Par10 in einem



Schema 1. Allgemeiner Verlauf der Synthese von *E.-coli*-Par10.

a,b) Harzbeladung und Festphasenpeptidsynthese; c–f) Linkeraktivierung, Peptidabspaltung, Entschützungs- und Reinigung; g,h) Harzbeladung und Festphasenpeptidsynthese; i–k) simultane Peptidabspaltung/Entschützungs- und Reinigung; l) ADP-katalysierte Ligation; m) N-Terminale Entschützungs- Z-Par10(1–35)-OGP: Z-AKTAAALHILVKEEKLA LDLLEQIKNGADFGKLAK-OGP; Par10(36–92): KHSICPSGKRGGDLGE-FRQQQMVPADFQVVFSCPV LEPTGPHLTQFGYHIKVLRYN. Bedingungen: 30 °C, 0.1 M HEPES-Puffer pH 8.0, 20 Vol.-% DMF, 1 mM TCEP, [Acyldonor] = 0.2 mM, [Acylakzeptor] = 0.1 mM, [Enzym] = 2.0 × 10^{−5} M. TCEP = Tris(2-carboxyethyl)phosphin.

Schritt durch enzymatische Ligation eines N^α-geschützten Par10(1–35)-OGP-Esters mit dem verbleibenden 57-mer-Fragment Par10(36–92). Die Ligationsstelle zwischen Lys35 und Lys36 ergab sich aus rein chemischen Aspekten (Effizienz der Synthese beider Fragmente). CD-spektroskopische Studien haben gezeigt, dass das längere Par10(36–92)-Fragment bereits ähnliche Strukturelemente wie das vollständige Par10 mit entsprechenden α-Helix- und β-Faltblattregionen aufweist (siehe Abbildung 1). Demzufolge liegt die Ligationsstelle in einem α-Helixmotiv, das im Vergleich zu Schleifen- oder β-Faltblattregionen nur schwer von Proteasen erkannt wird. Somit kann die proteasekatalysierte Synthese von Par10 in der vorliegenden Variante als schwierig angesehen werden. Die Synthese beider Ausgangsfragmente erfolgte an der Festphase nach der Fmoc-Strategie unter Verwendung von 2-Chlortritylchlorid-Harz^[12] für Par10(36–92) und von Kenners 4-Sulfamylbenzoyl-Aminomethyl(AM)-Harz^[13] für Z-Par10(1–35)-OGP (siehe die Hintergrundinformationen). Peptidabspaltung vom Harz, Entschützungs- und Reinigung ergaben die gewünschten Fragmente, die nachfolgend aus

Löslichkeitsgründen in Konzentrationen von 0.2 mM (Z-Par10(1–35)-OGp) bzw. 0.1 mM (Par10(36–92)) für die ADP-katalysierte Ligation verwendet wurden. Trotz dieser relativ geringen Konzentrationen war ein Zusatz von 20 Vol.-% DMF erforderlich, wobei zur Vermeidung von Oxidationen zusätzlich 1 mM TCEP zugesetzt wurde. Die Reaktion begann nach der ADP-Zugabe und benötigt 30 min bis zum vollständigen Esterumsatz unter Bildung des Ligationsprodukts. Ohne ADP war dagegen keine Reaktion detektierbar. Durch quantitative Analyse der ADP-vermittelten Synthese mithilfe von HPLC und SDS-PAGE (Abbildung 2d) konnte eine Ausbeute von 61 % bestimmt werden, die sehr gut mit dem Wert für die Synthese von Bz-L-Lys-L-Lys-NH₂ übereinstimmt (Tabelle 1) und eine hohe Flexibilität von ADP hinsichtlich der Länge von Acyldonor und -akzeptor anzeigt. Die korrekte Molmasse des synthetisierten Par10 wurde MALDI-TOF-massenspektrometrisch bestätigt (Abbildung 2b). Dass bei der Reaktion keine quantitative Ausbeute erhalten wurde, ist ausschließlich auf konkurrierende Hydrolysereaktionen von Z-Par10(1–35)-OGp zurückzuführen. Unerwünschte Spaltungen, wie sie bei L-Proteasen üblich sind, wurden dagegen auch bei 10-fach verlängerten Reaktionszeiten nicht detektiert (Abbildung 2d), und auch Mehrfachacylierungen, z.B. von nucleophilen Seitenketten, können praktisch ausgeschlossen werden, weil keine MS-Signale für Par10-Varianten mit höherem Molekulargewicht auftraten.

Nach erfolgter Reinigung und Rückfaltung wurden in CD- und Enzymkinetik-Studien die Struktur und Funktion des synthetisierten Par10 mit rekombinantem wt-Par10 verglichen. Die CD-Spektren (Abbildung 2c) weisen auf eine praktisch identische Struktur beider Par10-Spezies hin. Analoges wurde für die Stabilität beider Varianten in temperaturabhängigen CD-Messungen festgestellt (siehe die Hintergrundinformationen). Auch die Unterschiede in der katalytischen Effizienz sind nur marginal (Abbildung 2a).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass natürliche Proteasen – abweichend von der gängigen Lehrmeinung – zur Synthese nativer Proteine im wässrigen Medium ohne proteolytische Nebenreaktionen befähigt sind. Dabei wird ein irreversibler Syntheseverlauf lediglich durch Beachtung der inhärenten Stereospezifität dieser Enzyme in einfacher und flexibler Weise ermöglicht. Einschränkungen hinsichtlich der Sequenz an der Ligationsstelle, wie sie bei rein chemischen Syntheseverfahren wie der häufig verwendeten nativen chemischen Ligation auftreten, sind nur von geringer Bedeutung. Die Substratmimetika für die neue Ligationstechnik unterscheiden sich chemisch nur wenig von denen, die in anderen Verfahren angewendet werden. Synthesemethoden für diese Substratmimetika sind somit etabliert, wobei die breite Esterakzeptanz von ADP auch die Verwendung anderer Ester als der hier eingesetzten OGps ermöglicht. Zu beachten ist auch, dass mit ADP lediglich eine einzige, mehr oder weniger

zufällig ausgewählte D-Protease untersucht wurde. Ein breiteres Screening potenzieller D-Proteasen sollte folglich weitere, möglicherweise effizientere Ligationskatalysatoren identifizieren.

Eingegangen am 22. Januar 2008
Online veröffentlicht am 13. Juni 2008

Stichwörter: Peptidligation · Proteasen · Proteinsemisynthese · Substratmimetika

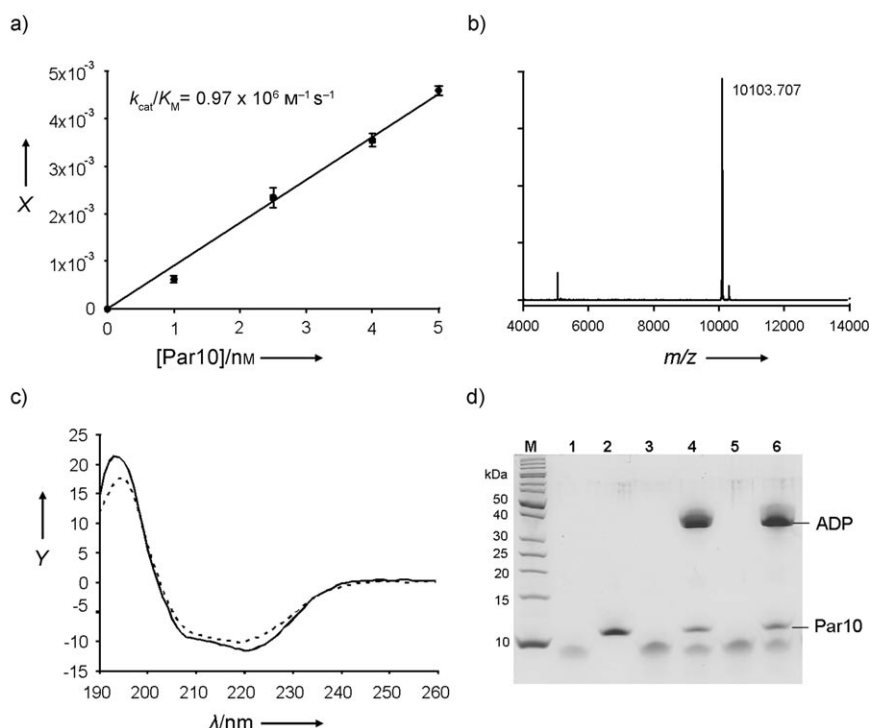


Abbildung 2. Charakterisierung von synthetischem *E.-coli*-Par10. a) Spezifitätskonstante $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von synthetischem Par10 (Fehler: $\pm 0.05 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und wt-Par10 ($2.0 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), X: Reaktionsgeschwindigkeit in s^{-1} ; b) MALDI-TOF-MS von synthetischem Par10 (Masse ber.: 10101); c) CD-Spektren von synthetischem (gestrichelte Linie) und wt-Par10 (durchgezogene Linie), Y: Elliptizität in mdeg; d) SDS-Page. M: Molekulargewichtsmarker, 1: Par10(36–92), 2: rekombinantes wt-Par10, 3: Reaktion ohne ADP (Reaktionszeit: 30 min), 4: Reaktion mit ADP (30 min), 5: Reaktion ohne ADP (5 h), 6: Reaktion mit ADP (5 h); die Intensität der Banden korreliert mit der unterschiedlichen Größe von ADP und Par10 und nicht mit deren vermeintlicher Konzentration.

- [1] a) F. Bordusa, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4817–4867; b) D. Kumar, T. C. Bhalla, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 68, 726–736; c) D. Goradia, J. Cooney, B. K. Hodnett, E. Magner, *Biotechnol. Prog.* **2006**, 22, 1125–1131.
- [2] M. Bergmann, H. Fraenkel-Conrat, *J. Biol. Chem.* **1937**, 119, 707–720; W. Kullmann, *Enzymatic Peptide Synthesis*, CRC, Boca Raton, **1987**.
- [3] a) N. Wehofskey, N. Koglin, S. Thust, F. Bordusa, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6126–6133; b) K. J. Doores, B. G. Davis, *Chem. Commun.* **2005**, 2, 168–170.
- [4] a) V. Cerovsky, J. Kockskämper, H. G. Glietsch, F. Bordusa, *ChemBioChem* **2000**, 1, 126–129; b) Z. Machova, R. Eggelkraut-Gottanka, N. Wehofskey, F. Bordusa, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 5065–5067; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4916–4918; Z. Machova, R. Eggelkraut-

- Gottanka, N. Wehofsky, F. Bordusa, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5065–4067.
- [5] D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stainley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, *266*, 243–247.
- [6] N. Wehofsky, S. Thust, J. Burmeister, S. Klusmann, F. Bordusa, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 701–704; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 677–679.
- [7] A. Kuhlewein, G. Voll, B. Hernandez Alvarez, H. Kessler, G. Fischer, J. U. Rahfeld, G. Gemmecker, *Protein Sci.* **2004**, *13*, 2378–2387.
- [8] a) Y. Asano, A. Nakazawa, Y. Kato, K. Kondo, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 14233–14239; b) Y. Asano, T. L. Lübbehüsen, *J. Biosci. Bioeng.* **2000**, *89*, 295–306; c) D. H. Baek, S.-J. Kwon, S.-P. H., M.-S. Kwak, M.-H. Lee, J. J. Song, S.-G. Lee, K.-H. Yoon, M.-H. Sung, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 980–986.
- [9] Y. Asano, H. Ito, T. Daiiri, Y. Kato, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 30256–30262.
- [10] F. Bordusa, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2002**, *3*, 159–180.
- [11] C. Scholz, J. Rahfeld, G. Fischer, F. X. Schmid, *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 752–762; C. Schiene-Fischer, C. Yu, *FEBS Lett.* **2001**, *495*, 1–6; G. Fischer, T. Aumüller, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2003**, *148*, 105–150.
- [12] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Enqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943–3946.
- [13] a) G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1971**, 636–637; b) B. J. Backes, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322–2330.