

# N-terminale Proteinmodifizierung mittels Substrat-aktivierter Katalyse\*\*

Sandra Liebscher, Michael Schöpfel, Tobias Aumüller, Ariunkhur Sharkhuukhen, Andreas Pech, Eva Höss, Christoph Parthier, Günther Jahreis, Milton T. Stubbs\* und Frank Bordusa\*

**Abstract:** Artificielle Funktionalisierungen von Proteinen stellen sowohl in der angewandten als auch in der Grundlagenforschung ein wichtiges Werkzeug dar und erweisen sich als eine Herausforderung für Proteinchemiker. Aufgrund ihrer nativen Regio- und Stereoselektivität bieten enzymatische Proteinmodifizierungen einen attraktiven Ansatz, jedoch ist eine universelle Anwendung durch deren hohe Spezifität beschränkt. Aufgrund der intrinsischen Reversibilität enzymatischer Reaktionen sind Proteinasen prinzipiell in der Lage auch Ligationen zu katalysieren. Dies macht sie zu einem interessanten Werkzeug für spezifische Proteinkonjugationen. Wir berichten über die Entwicklung einer hochspezifischen Trypsinvariante für die selektive N-terminale Modifizierung von Proteinen. Die Reaktion verläuft mit quantitativen Produktausbeuten unter nativen Bedingungen. Wir zeigen, dass die Variante eine ungeordnete Zymogen-ähnliche Aktivierungsdomäne aufweist, die in Gegenwart geeigneter Substrate in die aktive Konformation überführt wird.

Die gezielte regiospezifische Modifizierung von Proteinen steht im Fokus einer Vielzahl von Anwendungen sowohl in der Grundlagen- als auch in der angewandten Forschung, insbesondere für spektroskopische Untersuchungen von Substratbindung, Faltungsprozessen,<sup>[1]</sup> Katalysemechanismen und dynamische Konformationsänderungen<sup>[2]</sup> oder die Herstellung polymerkonjugierter therapeutischer Proteine.<sup>[3]</sup>

Breite Anwendung finden trotz ihrer fehlenden Regiospezifität chemoselektive Reagentien (z. B. Succinimide oder Maleimide),<sup>[4]</sup> die in großer Zahl kommerziell verfügbar sind. Durch die zahlreichen nukleophilen Aminosäurefunktionalitäten (z. B. Lysin- und Cystein-Seitenketten) entstehen bei solchen Ansätzen sehr wahrscheinlich heterogene Produktgemische mit unvorhersehbaren Eigenschaften. Solche reaktiven Funktionalitäten, z. B. Cysteine, lassen sich zwar mittels ortsgerichteter Mutagenese in das Zielprotein einfügen, allerdings müssen dazu bereits vorhandene reaktive Seitenketten ebenfalls ausgetauscht werden oder der genetische Code für das Einführen von nichtproteinogenen Aminosäuren mit orthogonaler Reaktivität erweitert werden.<sup>[5]</sup> Trotz enormer Fortschritte auf diesem Gebiet ist eine universelle Anwendung dieser Verfahren hinsichtlich der Vielfalt der einzuführenden Funktionalitäten begrenzt. Zudem sinken die Ausbeuten an modifiziertem Protein aufgrund der intrazellulären Toxizität vieler künstlicher Aminosäurederivate sowie der benötigten hohen Konzentration derselben.

Für regio- und stereoselektive Modifizierungen von Proteinen stellen Enzyme eine augenscheinliche Alternative dar, zumal hierfür ein breites Repertoire an potenziellen Katalysatoren von der Natur zur Verfügung gestellt wird. Eine universelle und einfache Anwendung insbesondere im präparativen Maßstab wird jedoch durch die hohe Spezifität, die Notwendigkeit des Einsatzes synthetisch anspruchsvoller Substrate sowie die oftmals komplexen Erkennungssequenzen, z. B. im Fall der Phosphopantheyltransferase (11 Aminosäuren) oder der Biotin-Ligase (15 Aminosäuren), verhindert.<sup>[6]</sup> So erkennen Transglutaminasen spezifische Glutamin-Seitenketten nur, wenn diese von ausgewählten Aminosäuren flankiert sind und sich zudem in einer hochflexiblen Region des Proteins befinden. Die Anwendung von Sortase, ein prinzipiell vielversprechendes Enzym für selektive Modifizierung von Proteinen mit einer Erkennungssequenz von fünf Aminosäuren, wird durch den hohen Überschuss des Biokatalysators sowie des Modifizierungsreagenzes (bedingt durch die Reversibilität und niedrigen Wechselzahlen der katalytischen Reaktionen) stark eingeschränkt,<sup>[7]</sup> obwohl diese Einschränkungen durch die Verwendung von Depsipeptiden zumindest teilweise umgangen werden können.<sup>[8]</sup>

Die Entwicklung einer universellen und flexiblen Methode für die regioselektive Einführung künstlicher Funktionalitäten in Proteine bleibt daher eine anspruchsvolle Herausforderung. Der Amino-Terminus von Proteinen stellt diesbezüglich ein attraktives Ziel für derartige Modifizierungen dar, da per Definition jede Proteinkette nur einen einzigen N-Terminus besitzt. Aufgrund der Reversibilität

[\*] Dr. S. Liebscher,<sup>[†]</sup> Dr. M. Schöpfel,<sup>[†]</sup> A. Sharkhuukhen, Dr. A. Pech, Dr. C. Parthier, Prof. Dr. M. T. Stubbs, Prof. Dr. F. Bordusa  
Institut für Biochemie und Biotechnologie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Kurt-Mothes-Straße 3, 06120 Halle/Saale (Deutschland)  
E-Mail: stubbs@biochemtech.uni-halle.de  
frank.bordusa@biochemtech.uni-halle.de

Dr. T. Aumüller, Dr. G. Jahreis  
Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung  
Weinbergweg 22, 06120 Halle/Saale (Deutschland)

Dr. E. Höss  
Roche Diagnostics GmbH  
Nonnenwald 2, 82372 Penzberg (Deutschland)

[†] S.L. und M.S. haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch das DFG-Schwerpunktprogramm SPPI623 „Chemoselektive Reaktionen für die Synthese und Anwendung funktionaler Proteine“ und das Protein-Kompetenznetzwerk-Halle (ProNet-T3), mit Unterstützung des BMBF, gefördert. Wir danken Angelika Schierhorn für massenspektrometrische Analysen und Uwe Müller (Freie Universität Berlin, BESSY) für Synchrotron-Messzeit.

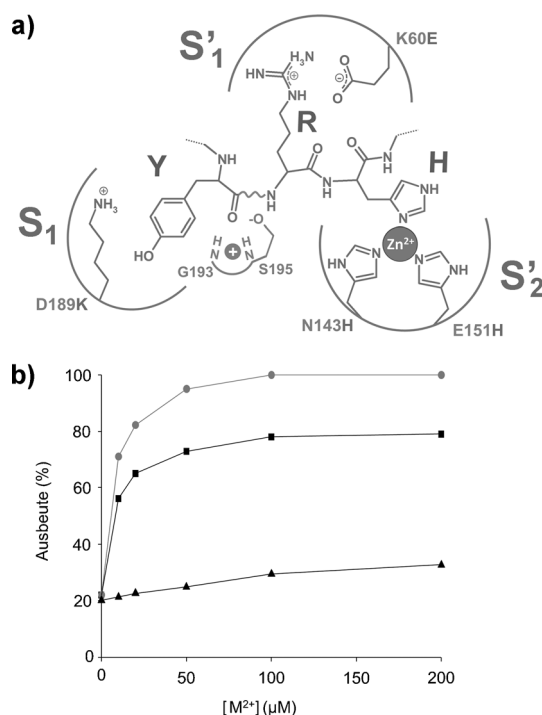
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201307736> zu finden.

enzymatischer Reaktionen könnte eine Ligation am N-Terminus durch Proteinasen erreicht werden, wie sie bereits für die bakterielle IgA-Protease<sup>[9]</sup> oder Subtiligase<sup>[10]</sup> demonstriert werden konnte. Nichtsdestotrotz weisen Proteinase jedoch einen generellen intrinsischen Nachteil auf: Die native Hydrolysereaktion ist gegenüber der Ligation stark bevorzugt, was eine sorgfältige kinetische oder thermodynamische Kontrolle der Reaktion unabdingbar macht. Eine Vielzahl von Studien basierend auf Lösungsmittel-, Substrat- und Enzym-Engineering fokussiert auf eine Verbesserung der Diskriminierung zwischen beiden Konkurrenzreaktionen.<sup>[11]</sup>

Insbesondere das Substratmimetika-Konzept (z. B. der Einsatz von Peptidyl-4-guanidinophenylestern (OGp), deren Esterabgangsgruppe die Trypsin-spezifische Aminosäure Arginin imitiert) ist vielversprechend, da es die Knüpfung einer Vielzahl von sogar nichtpeptidischen Acylresten auf Peptidsubstrate ermöglicht.<sup>[12]</sup>

Hier berichten wir über eine Trypsinvariante (welche wir Trypsiligase nennen), die eine ausgeprägte Präferenz für die Tripeptid-Sequenz YRH (natürliche Häufigkeit in bekannten Proteinen der SwissProt-Datenbank: ca. 0.5 %) aufweist.<sup>[13]</sup> Trypsiligase ist in der Lage, unter milden Reaktionsbedingungen in einer Eintopfreaktion sowohl die Y-R-Bindung innerhalb dieser Tripeptidsequenz zu spalten als auch diverse Funktionalitäten auf den neuen N-Terminus zu knüpfen. Wesentlich für diese neuartige Proteolyse- und Ligationselektivität ist der Zymogen-ähnliche Charakter der Trypsiligase, wobei das Enzym seine Trypsin-ähnliche und damit aktive Konformation erst nach Bindung spezifischer Substrate erhält. Die native Primärspezifität für basische Aminosäureseitenketten, welche in Zielproteinen sehr häufig zu finden sind und somit potenzielle Hydrolyseorte darstellen, beruht auf der Aminosäure D189, welche sich am Boden der S1-Bindungs tasche des Wildtyp(wt)-Enzyms befindet.<sup>[14]</sup> Trypsin D189K weist zwar eine geringe Esterase-Aktivität gegenüber P1-Tyrosin-Seitenketten auf,<sup>[15]</sup> ist proteolytisch jedoch nahezu inaktiv. Wir postulieren, dass diese generelle proteolytische Inaktivität durch zusätzliche Substratbindungsstellen in sekundären Bindsorten des Enzyms wiederhergestellt werden kann. Das Einbringen einer sauren Aminosäure am Boden des S1'-Bindungsortes durch den K60E-Austausch resultierte diesbezüglich in einer Trypsinvariante mit einer um zwei Größenordnungen erhöhten Aktivität gegenüber P1'-Arginin-Substraten im Vergleich zu Substraten mit einer anderen Aminosäure.<sup>[16]</sup> Eine weitere zusätzliche Substratbindestelle weist die Trypsinvariante N143H/E151H auf. Diese zeichnet sich durch eine 350-fach höhere Aktivität gegenüber Substraten mit P2'-Histidinresten aus.<sup>[17]</sup>

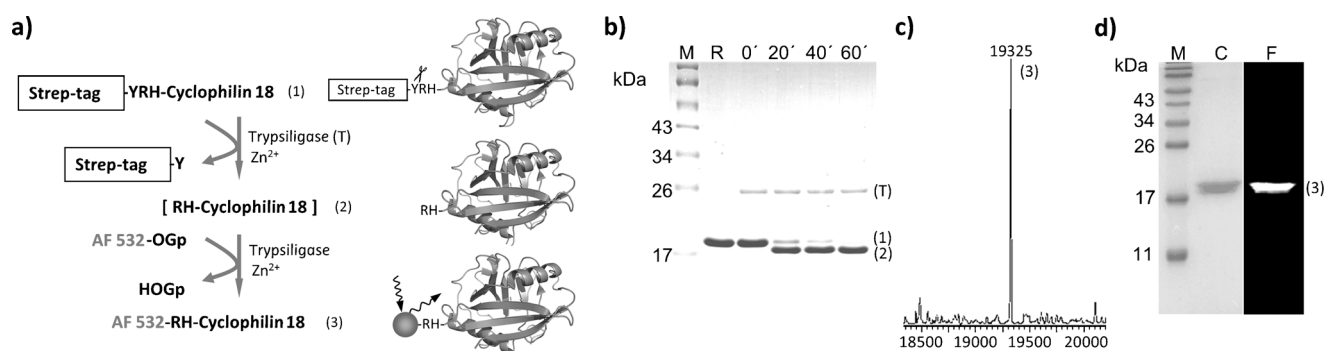
Wir haben jede dieser individuellen Eigenschaften miteinander kombiniert und die resultierende Vierfach-Trypsin-Variante K60E/N143H/E151H/D189K erzeugt (Trypsiligase; Abbildung 1). In Hydrolysestudien unter Verwendung einer Peptidbibliothek konnte die gewünschte Spezifität für die Erkennungssequenz YRH bestätigt werden. Jegliche Abweichung von dieser Sequenz resultierte in einer deutlichen Abnahme der katalytischen Effizienz (Abbildung S1). Zudem ist die Trypsiligase in der Lage das Substratmimetikum Acyl-4-OGp zu erkennen, sodass das maßgeschneiderte Enzym zudem über ein synthetisches Potenzial verfügen



**Abbildung 1.** Trypsiligase-Design und -Aktivität. a) Änderungen in den Bindungsstellen S1, S1' und S2' sowie die Einbindung der Sequenz YRH. Die Spaltung der entsprechenden Bindung (geschwungene Linie) wird durch das aktive S195 in Verbindung mit dem Oxyanionen-Loch (Rückgrat-Amide S195 und G193) erreicht. b) Acyltransfer des Benzoyl-Glycyl-4-Guanidinophenylesters (Bz-Gly-OGp) auf AHAAG katalysiert durch Trypsiligase in Gegenwart von Zn<sup>2+</sup> (●), Ni<sup>2+</sup> (■) beziehungsweise der Trypsinvariante K60E/D189K in Gegenwart von Zn<sup>2+</sup> (▲). Die Analyse erfolgte HPLC-basiert. Bedingungen: 2 mM Bz-Gly-OGp, 15 mM AHAAG, 50 μM Trypsinvariante, 100 μM ZnCl<sub>2</sub> bzw. NiCl<sub>2</sub>.

sollte. Trypsiligase-katalysierte Acyltransferreaktionen auf P2'-Histidin enthaltene Peptide können wie erwartet durch Metall-Dikationen induziert werden, was eine kinetische Reaktionsführung vereinfacht. Um die Effizienz des neuen Biokatalysators auch gegenüber Proteinsubstraten verifizieren zu können, wurde die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase) humanes Cyclophilin 18 (hCyp18) (Abbildung 2; Abbildung S2), welche 13 Lysine, 6 Arginine sowie 4 Cysteine enthält, als Modellprotein ausgewählt. Um eine effiziente Reinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie zu ermöglichen, wurde hCyp18 neben der Erkennungssequenz YRH auch mit einer zusätzlichen Affinitätsfusion Strep-tag II am N-Terminus versehen.<sup>[18]</sup>

Eine Inkubation der hCyp18-Variante mit Trypsiligase resultierte in einer quantitativen Spaltung der Affinitätsfusion innerhalb einer Stunde (Abbildung 2b). Auch nach zehnstündiger Inkubation konnte kein unerwünschtes Spaltprodukt detektiert werden. Im nächsten Schritt wurde dem Reaktionsansatz das Fluorophor AlexaFluor 532 in Form eines 4-Guanidinophenylester verknüpften Peptides (Ac-Cys(AlexaFluor 532)-Ala<sub>2</sub>-OGp; Abbildung S3) im dreifachen Überschuss zum hCyp18 zugesetzt. Der Acyltransfer auf dessen N-Terminus wurde mittels UPLC kinetisch verfolgt (Abbildung S4).



**Abbildung 2.** Trypsiligase-katalysierte N-terminale Spaltung der Affinitätsfusion und Modifizierung von humanem Cyclophilin 18. a) Schema der N-terminalen Modifizierungsreaktion. b) Zeitverlauf der Trypsiligase-katalysierten Spaltung des Strep-tag-II-Fusionspeptids verfolgt mittels SDS-PAGE. M: Größenstandard; R: Referenz (StrepII-YRH-Cyclophilin18). Bedingungen: 100  $\mu$ M StrepII-YRH-Cyclophilin18, 10  $\mu$ M Trypsiligase, 50  $\mu$ M  $ZnCl_2$ , 100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM  $CaCl_2$ , pH 7.8. c) ESI-Massenspektrum des Reaktionsansatzes zum Zeitpunkt  $t = 1$  h (berechnete Masse für AlexaFluor-532-modifiziertes hCyp18: 19322 Da). d) SDS-PAGE des isolierten Produkts AlexaFluor-532-hCyp18. M: Größenstandard; C: Coomassie-Färbung; F: In-Gel-Fluoreszenz.

Eine vollständige Modifizierung des hCyp18 konnte bereits innerhalb einer Stunde beobachtet und durch massenspektrometrische Analyse bestätigt werden (Abbildung 2c). Die gereinigte AlexaFluor-532-derivatisierte hCyp18-Variante zeigte in Aktivitätsmessungen eine zum Ausgangskonstrukt unveränderte katalytische Effizienz. Des Weiteren zeigte der Fluoreszenzfarbstoff nach Einführung in das Protein keine Änderung in der Quantenausbeute auf, was darauf hinweist, dass das Modifizierungsverfahren auch die Farbstoffeigenschaften nicht verändert. Neben dem AlexaFluor 532 konnte auch das Fluorophor Tetramethylrhodamin regio-spezifisch auf den N-Terminus des hCyp18 transferiert werden, was in diesem Fall zusätzlich durch massenspektrometrische Fragmentierungsexperimente bestätigt werden konnte (Abbildung S4). Um die Universalität dieser Methode zu unterstreichen, wurden zudem noch drei weitere Proteine unterschiedlicher Größe und Sekundärstruktur mit einer Vielzahl von OGp-Estersubstraten umgesetzt (Abbildung S2, S3 und S5). Die Inkubation der jeweiligen StrepII-YRH-Fusionsproteine mit Trypsiligase führte in jedem Fall zur selektiven und quantitativen Spaltung der Affinitätsfusion. Auch der darauffolgende Acyltransfer ausgewählter Funktionalitäten wie Biotin oder Polyethylenglykol verlief selektiv und mit quantitativen Produktausbeuten. Massenspektrometrisch konnte die Identität der erhaltenen Proteinderivate verifiziert und die Bildung unerwünschter Spalt- respektive Nebenprodukte ausgeschlossen werden. Schlussendlich verfügten zudem alle modifizierten Proteine nach der Modifizierungsreaktion über unveränderte katalytische Aktivität (Tabelle S1).

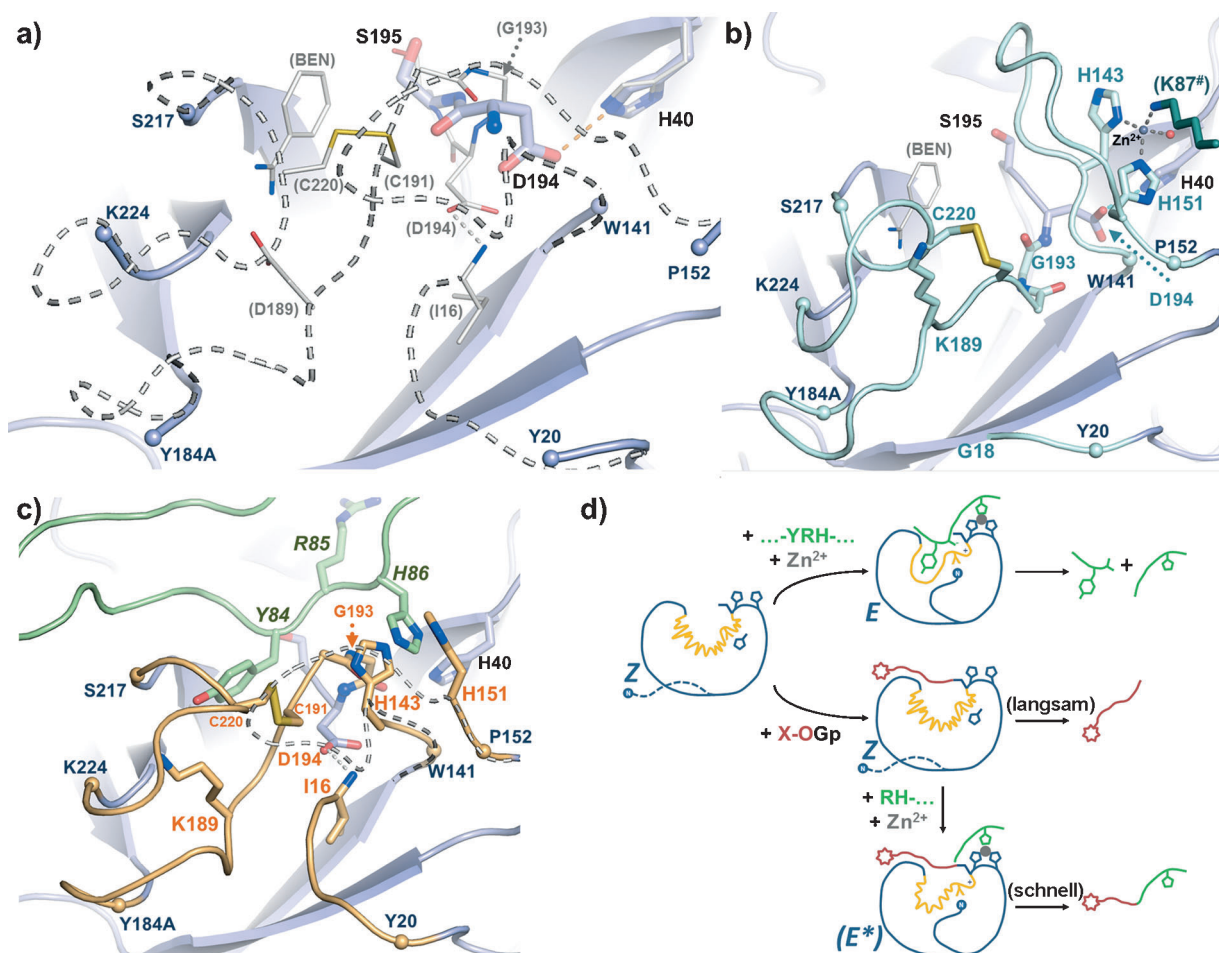
Trypsiligase kristallisierte in verschiedenen Kristallformen, einschließlich der üblichen trigonalen und orthorhombischen Form, die zumeist für Trypsin beobachtet wird.<sup>[19]</sup> Interessanterweise konnte für erstgenannte nur schwache oder keine geordnete Elektronendichte für die Seitenketten der Aminosäuren I16–G19, G142–P152, L185–D194 und S217–N223, welche das aktive Zentrum und die S1-Tasche umgeben, beobachtet werden (Abbildung 3a, Abbildung S6). Diese Aminosäureseitenketten werden der Aktivierungsdomäne des Trypsinogens zugeordnet,<sup>[20]</sup> welche im Vorläufer-

Zymogen ungeordnet vorliegt und sich erst durch Entero-peptidase-Spaltung zum aktiven Trypsin strukturiert, was dem molekularen Mechanismus der Proteinase-Aktivierung entspricht. Ansätze, Zinkionen in diese Kristallform zu implementieren, um eine Elektronendichte für die „Loops“, welche die eingeführten Histidine tragen, zu erhalten, sind fehlgeschlagen. Andererseits ist die Aktivierungsdomäne in der orthorhombischen Form durchaus geordnet, obwohl diese in der inaktiven Konformation vorliegt, was an der Wechselwirkung von D194 und H40 in der Zymogen-Triade deutlich wird.<sup>[21]</sup> „Soaking“-Experimente mit Zinkionen zeigen eine deutliche Elektronendichte für das Dikation, welches von N143H, E151H und K87<sup>#</sup> eines symmetrieverwandten Moleküls koordiniert wird, obwohl keine signifikanten Umstrukturierungen im Protein beobachtet wurden (Abbildung 3b, Abbildung S6b).

Kokristallisation mit der Trypsininhibitor-Variante YRH-Ecotin ergab Kristallformen bestehend aus vier Komplexen in einer asymmetrischen Einheit. Während in jedem der Komplexe ungeordnete Bereiche der Trypsiligase vorlagen, nahm die Aktivierungsdomäne in drei der vier Komplexe eine Trypsin-ähnliche aktive Konformation an (Abbildung 3c, Abbildung S7), in der D194 mit dem N-Terminus I16 eine Salzbrücke bildet, um das Oxyanionen-Loch zu formen, welches für die Katalyse unabdingbar ist (durch korrekte Ausrichtung der Rückgrat-Amide von G193 und S195).

Zusammenfassend weisen die Strukturanalysen darauf hin, dass sich die Trypsiligase auch nach der Aktivierung in einem Zymogen-ähnlichen und damit inaktiven Zustand befindet. Um dies zu prüfen, wurden weitere Untersuchungen zur Reaktivität von Trypsin, Trypsinogen und Trypsiligase gegenüber dem Suizidsubstrat 4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluorid (AEBSF), welches ähnlich wie PMSF kovalent und hochspezifisch ausschließlich an die reaktive Hydroxygruppe aktiver Serinproteinasen bindet. Massenspektrometrische Analysen zeigen deutlich, dass Trypsiligase unter den verwendeten Bedingungen im Gegensatz zu Trypsin (vollständig modifiziert) und Trypsinogen (vollständig unmodifiziert) nur partiell durch AEBSF modifiziert wird (Abbildung S8). Diese Indizien sprechen für den in Abbildung 3d gezeigten mole-





**Abbildung 3.** Trypsinogen nimmt in Abwesenheit geeigneter Liganden eine Zymogen-ähnliche Struktur ein. a) Die Aktivierungsdomäne ist in der trigonalen Kristallform I ungeordnet. Geordnete Trypsinogen-Seitenketten sind als Cartoon und Stabmodell in blau dargestellt; zu beachten ist die Interaktion zwischen den Seitenketten D194 und H40 (der „Zymogen-Triade“). Zum Vergleich ist Wildtyp-Trypsin in weiß dargestellt (gestrichelter Cartoon/dünne Stäbe; PDB-Nummer: 1MTS). Der Inhibitor Benzamidin markiert die S1-Tasche. Aktivierung des Wildtyp-Trypsinogens führt zu einer Salzbrücke zwischen D194 und dem neu gebildeten N-Terminus I16, was in der Ausbildung des Oxyanionen-Lochs (Rückgrat-Amide S195 und G193) und Umstrukturierungen in der S1-Tasche resultiert (am Boden durch D189 und die Disulfidbrücke C191-C220 begrenzt). b) Obwohl Seitenketten der Trypsinogen-Aktivierungsdomäne (cyan) in der orthorhombischen Kristallform II definiert sind, ist weder das Oxyanionen-Loch noch die S1-Tasche für eine enzymatische Aktivität korrekt positioniert. Die eingefügte Bindestelle für Metallionen ist durch ein Zinkion besetzt, wobei ein symmetrieverwandtes Molekül den zusätzlichen Liganden zur Verfügung stellt (K87<sup>#</sup>). c) Im Komplex mit dem Substrat-ähnlichen Inhibitor YRH-Ecotin (grün) nimmt Trypsinogen seine aktive Konformation ein und die S1-Tasche ist mit der Tyrosin-Seitenkette besetzt. d) Der postulierte Substrat-vermittelte Aktivierungsmechanismus für Peptidligationen: Trypsinogen hat eine Zymogen-ähnliche Struktur (Z: flexibles N-terminales Peptid, Wechselwirkung von D194 mit H40, gelb bzw. blau), die in Gegenwart YRH-enthaltener Substrate und Zinkionen in die aktive Konformation überführt wird (E: Salzbrücke zwischen D194 und I16, Bildung der S1-Tasche und des Oxyanionen-Lochs), um die Y-R-Bindung zu spalten. Reaktive O-Guanidinophenylester können das Enzym in seiner Zymogen(-ähnlichen) Konformation acylieren und werden aufgrund des gestörten Oxyanionen-Lochs nur langsam hydrolysiert. Wir gehen davon aus, dass dieses in Gegenwart von Zinkionen und N-terminal RH-enthaltene Peptiden partiell gebildet wird (hypothetischer Zustand E\*) wodurch die Aminolyse (Peptidligation) kinetisch bevorzugt ist.

kularen Mechanismus für die vorgestellte Ligationsreaktion. Der Begriff Konformationsgleichgewicht zwischen Zymogen und aktivem Enzym (Zymogenität) ist für Trypsin-ähnliche Serinproteinase-Familien bereits beschrieben.<sup>[22]</sup> Im Unterschied zu Trypsin ist das Gleichgewicht zwischen ungeordneter inaktiver (Trypsinogen-ähnlicher) und geordneter aktiver (Trypsin-ähnlicher) Struktur bei der Trypsinogen deutlich in Richtung zymogener (ungeordneter) Konformation verschoben. Dieses Verhalten konnte auch für die Trypsinvariante D189S beobachtet werden,<sup>[23]</sup> was zu der Vermutung führt, dass der Aminosäureaustausch D189 K sowohl zu einer

Destabilisierung der S1 als auch der Aktivierungsdomäne führt. In der Tat bildet die Carboxy-Seitenkette von D189 im Wildtyp-Trypsin Wasserstoffbrücken zu den Amidgruppen von S190 (2.7 Å), A221 (3.0 Å) und G226 (3.5 Å), die die S1-Bindungstasche begrenzen – Wechselwirkungen, die durch die Mutation zum Lysin in Trypsinogen nicht möglich sind. Die Einpassung hochaffiner Substrate, welche die Erkennungssequenz YRH enthalten, verschiebt das Konformationsgleichgewicht, was ausreichend Energie liefert, um das Enzym in die aktive Konformation zu zwingen. Dadurch findet eine Hydrolyse von Peptidsubstraten (nahezu aus-

schließlich) in Gegenwart von YRH-enthaltenen Substratsequenzen statt. Auf der anderen Seite weist die Zymogen-ähnliche Struktur in einem der vier Trypsin-Moleküle im Komplex mit YRH-Ecotin darauf hin, dass diese Verschiebung hin zur Zymogen-ähnlichen Konformation unvollständig zu sein scheint. Das erklärt weshalb der Transfer Enzymgebundener Acylreste auf spezifische Arg-His-Akzeptorpeptide (Ligationsreaktion) gegenüber dem Transfer auf Wasser (Hydrolyse) bevorzugt ist. Da das gebildete Produkt nicht mehr über eine intakte Erkennungssequenz verfügt, ist die Rückreaktion (Proteolyse) praktisch nicht existent, sodass die Modifizierungsreaktion nicht nur quantitativ sondern auch irreversibel verläuft.

Änderungen in der Integrität der Aktivierungsdomäne sind bekannte Phänomene für Trypsin-ähnliche Proteinasen und reichen vom „aktiven Zymogen“ beim gewebsspezifischen Plasminogenaktivator<sup>[22]</sup> über die „An-aus“-Aktivierung bei Trypsin/Trypsinogen<sup>[21]</sup> bis zum dem Blutgerinnungsfaktor IXa, der bei fehlendem Kofaktor und Substrat nahezu inaktiv ist.<sup>[24]</sup> Auch die Existenz von Intermediaten solcher Enzymformen wurde bereits diskutiert.<sup>[25]</sup> Des Weiteren ist bekannt, dass der Übergang vom ungeordneten zum geordneten Zustand im Wesentlichen reversibel ist: Trypsinogen kann durchaus durch ausgeprägte Ligandbindung in die aktive Konformation<sup>[26]</sup> und Trypsin durch Inaktivierung durch Serpine in eine Zymogen-ähnliche Form gezwungen werden.<sup>[27]</sup>

Unseres Wissens stellt der beschriebene Katalysemechanismus der Trypsinase jedoch die erste Anwendung einer Substrat-aktivierten Katalyse als erweiterte Form sowohl des „Induced Fit“ als auch der bereits bekannten Substrat-assistierten Katalyse dar. Zu den üblichen Vorteilen von Enzymen (Aktivität unter milden Reaktionsbedingungen mit strenger Kontrolle der Regio- und Stereoselektivität) ermöglicht der hier beschriebene Mechanismus hochselektive Proteinmodifizierungen. Basierend auf diesem Konzept ist zum einen die Entwicklung orthogonaler Substrat-Ligase-Paare für spezifische Anwendungen denkbar sowie eine einfache Anpassung an biotechnologische Prozesse möglich. Obwohl die aktivierte Form der Trypsinase destabilisiert ist, profitiert der Ansatz von der Robustheit des Wildtyp-Enzyms, was in einer ausgeprägten Toleranz gegenüber ausgewählten Additiven und Reaktionsbedingungen resultiert. Bedingt durch die hochrestriktive Spaltaktivität auf der einen Seite und die quantitativen Produktausbeuten auf der anderen ermöglicht der Trypsinase-basierte Modifizierungsansatz die Kompatibilität mit bereits etablierten Methoden der Proteinexpression, wie z.B. die Spaltung von Affinitätsfusionen und zeigt einen neuen universellen Weg vom Gen zum modifizierten Zielprotein auf (Abbildung S1 d).

Schlussendlich ist es nicht undenkbar, dass die Natur selbst sich dieses Prinzips als eine Art Erweiterung zur Kofaktor und Substrataktivierung, wie es für die Convertase beschrieben ist,<sup>[28]</sup> in bislang unentdeckten enzymatischen Reaktionen angeeignet hat.

Eingegangen am 3. September 2013,  
veränderte Fassung am 14. November 2013  
Online veröffentlicht am 12. Februar 2014

**Stichwörter:** Biokatalyse · Biokonjugation · Proteinasen · Proteinmodifizierung · Reverse Proteolyse

- [1] B. Schuler, E. A. Lipman, W. A. Eaton, *Nature* **2002**, 419, 743–747.
- [2] S. Weiss, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 724–729.
- [3] J. M. Harris, R. B. Chess, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 214–221.
- [4] E. Baslé, N. Joubert, M. Pucheault, *Chem. Biol.* **2010**, 17, 213–227.
- [5] G. Srinivasan, C. M. James, J. A. Krzycki, *Science* **2002**, 296, 1459–1462.
- [6] M. Rashidian, J. K. Dozier, M. D. Distefano, *Bioconjugate Chem.* **2013**, 24, 1277–1294.
- [7] H. Mao, S. A. Hart, A. Schink, B. A. Pollok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2670–2671.
- [8] D. J. Williamson, M. A. Fascione, M. E. Webb, W. B. Turnbull, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 9511–9514; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 9377–9380.
- [9] M. Lewinska, C. Seitz, A. Skerra, F. P. Schmidtchen, *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 231–234.
- [10] D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, 266, 243–247.
- [11] F. Bordusa, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4817–4868.
- [12] M. Thormann, S. Thust, H. J. Hofmann, F. Bordusa, *Biochemistry* **1999**, 38, 6056–6062.
- [13] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 3389–3402.
- [14] B. S. Hartley, D. M. Shotton, D. B. Paul, *The Enzymes*, Vol. 3, Academic Press, **1971**, S. 323–373.
- [15] L. Graf, C. S. Craik, A. Patthy, S. Rocznik, R. J. Fletterick, W. J. Rutter, *Biochemistry* **1987**, 26, 2616–2623.
- [16] T. Kurth, S. Grah, M. Thormann, D. Ullmann, H. J. Hofmann, H. D. Jakubke, L. Hedstrom, *Biochemistry* **1998**, 37, 11434–11440.
- [17] W. S. Willett, L. S. Brinen, R. J. Fletterick, C. S. Craik, *Biochemistry* **1996**, 35, 5992–5998.
- [18] S. Voss, A. Skerra, *Protein Eng.* **1997**, 10, 975–982.
- [19] a) M. T. Stubbs, R. Huber, W. Bode, *FEBS Lett.* **1995**, 375, 103–107; b) M. T. Stubbs, S. Reyda, F. Dullweber, M. Moller, G. Klebe, D. Dorsch, W. W. Mederski, H. Wurziger, *ChemBioChem* **2002**, 3, 246–249.
- [20] R. Huber, W. Bode, *Acc. Chem. Res.* **1978**, 11, 114–122.
- [21] E. L. Madison, A. Kobe, M. J. Gething, J. F. Sambrook, E. J. Goldsmith, *Science* **1993**, 262, 419–421.
- [22] M. T. Stubbs, M. Renatus, W. Bode, *Biol. Chem.* **1998**, 379, 95–103.
- [23] E. Szabo, Z. Bocskei, G. Naray-Szabo, L. Graf, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 263, 20–26.
- [24] T. Zögg, H. Brandstetter, *Structure* **2009**, 17, 1669–1678.
- [25] N. Pozzi, A. D. Vogt, D. W. Gohara, E. Di Cera, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, 22, 421–431.
- [26] M. Bolognesi, G. Gatti, E. Menegatti, M. Guarneri, M. Marquart, E. Papamokos, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1982**, 162, 839–868.
- [27] J. A. Huntington, R. J. Read, R. W. Carrell, *Nature* **2000**, 407, 923–926.
- [28] F. Forneris, D. Ricklin, J. Wu, A. Tzekou, R. S. Wallace, J. D. Lambris, P. Gros, *Science* **2010**, 330, 1816–1820.