
BACHELORARBEIT

Herr
Ludwig Krauß

**Entwicklung eines Modellsystems
zur diagnostischen Evaluierung von
D-stereospezifischen Hydrolasen und
-varianten**

Mittweida, 2023

BACHELORARBEIT

Entwicklung eines Modellsystems zur diagnostischen Evaluierung von D-stereospezifischen Hydrolasen und - varianten

Autor:

Herr Ludwig Krauß

Studiengang:

Biotechnologie und Bioinformatik

Seminargruppe:

BT18wU-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbel Wünschiers

Zweitprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. Frank Bordusa

weitere Betreuer:

Dr. rer. nat. Lars Franke

Dr. rer. nat. Sandra Liebscher

Einreichung:

Mittweida, 30.01.2023

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2023

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Röbbbe Wünschiers bedanken, für die gute Betreuung während meines Praxismoduls.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Frank Bordusa für die Vergabe des interessanten und vielfältigen Themas und für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Besonderer Dank gilt Dr. Lars Franke und Dr. Sandra Liebscher, welche mich praktisch betreut haben. Sie brachten mir viel Geduld bei der Beantwortung zahlreicher Fragen entgegen und halfen mir mit ihren Ratschlägen. Für die Diskussionen über die Ergebnisse und die mehrfach kritische Betrachtung der Arbeit bin ich sehr dankbar.

Auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Naturstoffbiochemie gilt mein Dank für die willkommene Aufnahme, ein angenehmes Arbeitsklima und der Hilfsbereitschaft bei Herausforderungen und Fragen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, sowohl für die finanzielle als auch emotionale Unterstützung bei meinem Studium. Durch sie habe ich die Möglichkeit bekommen, mich mit Leidenschaft und ohne Druck dem Studium zu widmen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 <i>L</i> - und <i>D</i> -Aminosäuren	1
1.1.1 Bedeutung von <i>D</i> -Aminosäuren	1
1.1.2 Vorkommen von <i>D</i> -Aminosäuren in Polypeptiden	2
1.2 <i>D</i> -Hydrolasen	3
1.2.1 <i>D</i> -Aminosäure-erkennende Proteine	3
1.2.2 <i>D</i> -Peptidasen und <i>D</i> -Hydrolasen	3
1.3 Parvulin 10 als Modellsystem.....	4
1.3.1 PPIasenfamilie – Parvuline.....	4
1.3.2 Parvulin 10.....	4
1.3.3 Modellsystem Parvulin 10 der AG Naturstoffbiochemie	5
1.4 Proteinspleißen	6
1.5 Festphasenpeptidsynthese (SPPS)	7
1.6 Natürlich chemische Ligation (NCL)	8
2 Zielstellung	9
3 Material	10
3.1 Chemikalien.....	10
3.2 Puffer	10
3.3 Medien	12
3.4 Molekularbiologische Reagenzien	12
3.5 Verbrauchsmaterialien.....	12
3.6 Geräte.....	13
3.7 Enzyme	14
3.8 <i>E. coli</i> - Stamm	14
4 Methoden.....	15
4.1 Synthese der Par10-Derivate	15
4.1.1 Intein-vermittelte Synthese des <i>N</i> -terminalen-Fragmentes als Thioester.....	15
4.1.2 Synthese der <i>C</i> -terminalen Par10-Fragmente (68-92).....	16

4.1.3	Reinigung der C-terminalen Par10-Fragmente per präparativer HPLC.....	16
4.2	Initiale Hydrolysestudie.....	17
4.3	Natürlich chemische Ligation (NCL).....	17
4.4	Reinigungsstrategien der Ligationsansätze	18
4.4.1	Trennung nach Molekulargewicht / Molekularvolumen	18
4.4.2	Trennung nach Polaren Wechselwirkungen	18
4.4.3	Trennung nach Hydrophobizitäten	19
4.5	Aktivitätstestung per PPIase-Assay.....	19
5	Ergebnisse	20
5.1	Synthese der Par10- Varianten	20
5.1.1	Generierung des N-terminalen Par10-Fragmentes (1-67) als Thioester.....	20
5.1.2	Synthese und Reinigung der C-terminalen Par10-Fragmente (68-92).....	21
5.2	Initiale Hydrolysestudie.....	22
5.3	Natürlich chemische Ligation (NCL).....	23
5.3.1	Vergleich Parvulin- und Thioesterkonzentration	23
5.3.2	Ligation in NCL-Puffer mit verschiedenen Peptidkonzentrationen.....	24
5.3.3	NCL mit verschiedenen Peptidzusätzen und Thiolen	25
5.4	Reinigungsstrategien	29
5.4.1	Molekulargewicht / Molekularvolumen	29
5.4.2	Polare Wechselwirkungen	29
5.4.3	Hydrophobizitäten	30
5.5	Bestimmung der Aktivität	32
6	Diskussion.....	33
6.1	Synthese Par10 (1-67) als Thioester.....	33
6.2	Synthese und Aufreinigung der Par10-Fragmente (68-92)	34
6.3	Initiale Hydrolysestudie.....	34
6.3.1	Hydrolysestudie Peptid Pf (F83f).....	35
6.3.2	Hydrolysestudie Peptid Py	36
6.3.3	Hydrolysestudie des Peptides Pv.....	36
6.4.	Natürlich Chemische Ligation (NCL)	37
6.4.1	Ligation mit NCL-Puffer und verschiedenen Peptidkonzentrationen	38
6.4.2	Ligation mit verschiedenen Peptidzusätzen und Thiolen.....	39
6.4.3	Ligation mit chaotropen Salzen.....	40
6.4.4	NCL mit organischen Lösungsmitteln.....	41

6.5 Reinigungsstrategien	41
6.5.1 Molekulargewicht/ Molekularvolumen	42
6.5.2 Polare Wechselwirkungen	42
6.5.3 Hydrophobizitäten	43
6.6 Bestimmung der Aktivität	45
7 Zusammenfassung	46
8 Ausblick	47
Literaturverzeichnis	VII
Anhang.....	XIV
Selbstständigkeitserklärung	XXXII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: SDS-Gel der Synthese des Par10 (1-67).	21
Abbildung 2 UPLC-MS Analyse und Reinigung des synthetisierten Peptides Pf.	22
Abbildung 3 Masse des Thioester- freie Säure Verhältnis	24
Abbildung 4 SDS-Gel der Ligation des Par10 in NCL-Puffer.....	25
Abbildung 5 SDS-Page der Ligation des Par10 mit NCL-Puffer.....	26
Abbildung 6 SDS-Gel der Ligation des Par10 mit NCL-Puffer.....	27
Abbildung 7 SDS-Gel NCL nach Kationenaustauscher.....	30
Abbildung 8 SDS-Gel NCL nach hydrophober Trennung per HPLC (C8).	31

Tabellenverzeichnis

Tabelle A: <i>N</i> -terminale Fragment Sequenzen (1-67) mit Molekularen Massen	6
Tabelle B: <i>C</i> -terminale Peptidsequenzen mit markierter Substitutionsstelle	6
Tabelle C: Sequenz ligierten Parvulin-Derivate mit Substitutionstelle.....	8
Tabelle D: Schema der Durchführung der Affinitätschromatographie für die Generierung des Thioester	16
Tabelle E: Zusammensetzung der Ligationsansätze.....	17
Tabelle F: Ablauf der Kationenaustauschchromatographie	18
Tabelle G: Hydrolyse der synthetisierten Peptide durch <i>D</i> -Hydrolasen.	23
Tabelle H: Vergleiche und Bewertung der Ligationsoptimierungen.....	27
Tabelle I: Vergleiche der Reinigungsstrategien	31
Tabelle J: Parvulinaktivitäten im Vergleich.	32
Material I: Chemikalien.....	10
Material II: allgemeine Puffer	10
Material III: Puffer für SDS-Pages.....	11
Material IV: Medien	12
Material V: Molekularbiologische Reagenzien.....	12
Material VI: Verbrauchsmaterialien	12
Material VII: Geräte	13
Material VIII: Enzyme.....	14
Material IX: <i>E. coli</i> -Stamm	14

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
ADP	alkalische <i>D</i> -Peptidase
AS	Aminosäure
<i>B. thr.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
DAAO	<i>D</i> -Aminosäureoxidase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Gua	Guanidin
<i>h</i> Pin1	humanes Pin1
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
NCL	Natürlich chemische Ligation
NDMA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NMWL	Nominal Molecular Weight Limit
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
Par 10	Parvulin 10
PPasen	Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerasen
rpm	<i>rounds per minute</i>
SPPS	<i>Solid-Phase Peptide Synthesis</i>
UPLC-MS	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography – Mass spectrometry</i>

Ein- und Dreibuchstabencode für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin
R	Arg	Arginin	H	His	Histidin	S	Ser	Serin
N	Asn	Asparagin	I	Ile	Isoleucin	T	Thr	Threonin
D	Asp	Asparagin- säure	L	Leu	Leucin	W	Trp	Tryptophan
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	Y	Tyr	Tyrosin
Q	Gln	Glutamin	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
E	Glu	Glutamin- säure	F	Phe	Phenylalanin			

1 Einleitung

Biochemie ist die Lehre von chemischen Vorgängen in Lebewesen und deren Stoffwechsel. Eine wesentliche Rolle innerhalb dieser Vorgänge haben Proteine beispielsweise in Stoffwechselprozessen, der Stabilität von Zellen und der Immunabwehr [Voet et al, 2018].

1.1 L- und D-Aminosäuren

Proteine in lebenden Organismen werden aus kanonischen α -Aminosäuren gebildet, von denen 20 bekannt sind. α -Aminosäuren, die durch Peptidbindungen verbunden sind, bilden Peptide, die Strukturen aufbauen können, um größere Makromoleküle, die Proteine, zu bilden [Voet et al, 2018]. Die Klassifizierung basiert auf den Substituenten am $C\alpha$ -Atom [Voet et al, 2018]. Alle Aminosäuren, mit Ausnahme von Glycin, weisen Chiralität am $C\alpha$ -Atom auf. Die Konfiguration der vier Substituenten am $C\alpha$ -Atom führt zu zwei verschiedenen räumlichen Anordnungen, die in *L*- und *D*-Aminosäuren unterteilt werden. [Neuberger 1948], [Voet et al, 2018]. *L*- und *D*-Enantiomere sind in ihren physikochemischen Eigenschaften identisch, aber die entsprechenden Enzyme sind in der Lage, zwischen beiden Konformeren zu unterscheiden. [Bentley, 2009]. Proteine werden in ihrer Biosynthese ausschließlich durch *L*-Aminosäuren gebildet, obwohl der genaue Grund dafür nicht vollständig geklärt ist. So lagen bei einer Untersuchung von Proteindatenbanken gerade einmal 837 von 188 Millionen untersuchten Aminosäuren in *D*-Konfiguration vor [Baliban et al, 2011]. Dennoch können einzelne *D*-Aminosäuren in Proteinen vorkommen, meist als posttranslationale Modifikationen. [D`Aniello et al, 1992].

1.1.1 Bedeutung von D-Aminosäuren

In den 1920er Jahren wurden *D*-Aminosäuren zum ersten Mal in lebenden Organismen nachgewiesen [Ollivaux et al, 2014]. Im Jahr 1949 wurde eine erhöhte Konzentration von *D*-Aminosäuren in Tumoren von Säugetieren beschrieben [Kögl, 1949]. Zu dieser Zeit erwies sich der Nachweis dieser Aminosäuren aufgrund ihrer identischen Eigenschaften als schwierig [Konno et al, 2009]. Erst in den 1980er Jahren konnten durch verbesserte Analytik vermehrt *D*-Aminosäuren nachgewiesen werden, was erstmals die Beschreibung ihrer physiologischen Wirkungen ermöglichte [Ollivaux et al, 2014;], [Yoshimura et al, 2016]. In der Medizin spielen *D*-Aminosäuren schon seit langem eine wichtige Rolle, da sie in Antibiotika wie Bacitracin, Tyrosidin und Gramacidin vorkommen [Asano et al, 1996]. Krankheiten wie Arteriosklerose und Alzheimer wurden mit dem Auftreten von *D*-Aminosäuren in Verbindung gebracht [Piubelli et al, 2021]. Trotz der medizinischen

Bedeutung ist der Nachweis von *D*-Aminosäuren bis heute, aufgrund ihrer physikochemischen Ähnlichkeit zu *L*-Aminosäuren, äußerst aufwendig. Analytische Methoden zur Diagnostik von *D*-Aminosäuren sind für die funktionelle Aufklärung ihrer Funktion und Wirkung unerlässlich.

1.1.2 Vorkommen von *D*-Aminosäuren in Polypeptiden

In höheren Organismen wurden *D*-Aminosäuren erstmals in bakteriellen Zellwänden nachgewiesen. Zunächst konnten diesen keine biologischen Funktionen nachgewiesen werden [Corrigan, 1969]. In den folgenden Jahren wurde jedoch ihre physiologische Bedeutung erkannt. *D*-Aminosäuren kommen *in vivo* sowohl als freie Aminosäuren, als auch in Peptiden und Proteinen vor. Hauptsächlich treten *D*-Alanin, *D*-Aspartat und *D*-Serin als freie Aminosäuren in Organismen auf. *D*-Serin kommt zum Beispiel im Gehirn von Säugetieren vor. Es dient als Ligand für den *N*-methyl-*D*-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor) [Schell et al, 1995], [Wolosker et al, 1999]. Eine Beeinträchtigung dieses Rezeptors führt zum Absterben von Nervenzellen und damit zu Psychosen, Gedächtnisstörungen und Lernbeeinträchtigungen [Choi et al, 1988], [Newcomer et al, 2000], [Hardingham et al, 2003], [Dong et al, 2009]. Andere *D*-Aminosäuren lassen sich in wesentlich geringeren Konzentrationen nachweisen. Für diese ist noch keine Funktion bekannt [Hamase et al, 2007], [Han et al, 2011]. Peptide, die *D*-Aminosäuren enthalten, kommen nachweislich in Lurchen, Molusken, Spinnen und Krustentieren vor [Ollivaux et al, 2014]. Bei Mollusken haben sie beispielsweise hormonelle Eigenschaften und beeinflussen die Muskelkontraktion [Morishita et al, 1997]. Im Vergleich dazu ist bei *all-L*-Peptiden keine oder eine verminderte Aktivität festzustellen. In Proteinstrukturen besitzen *D*-Aminosäuren keine entsprechenden Funktionen. Proteogenetisch werden *D*-Aminosäuren durch spontane Isomerisierung bei posttranslationalen Modifikationen gebildet. Dies führt zu strukturellen und damit funktionellen Veränderungen der Proteine. Diese Änderung kann mit Pathogenese und diversen Proteinfaltungserkrankungen assoziiert werden [Fujii, 2002]. So sollten in regenerativen Proteinen von höheren Organismen keine *D*-Aminosäuren vorkommen. Bei Alzheimer wurde eine erhöhte Konzentration an *D*-Alanin in den metabolischen stabilen Proteinen des Nervensystems aufgefunden. Die daraus resultierende Bedeutung für die Krankheit ist bislang nicht hinreichend geklärt. Der Befund selbst deutet jedoch auf eine pathologische *L-D*-Isomerisierung dieser Proteine hin. Diese bildet sich durch Posttranslationale Modifikationen [D'Aniello et al, 1992]. Das Prinzip der spontanen Isomerisierung von *D*-Aminosäuren in Peptiden oder Proteinen ist nicht zufällig. Genauere

Mechanismen wurden jedoch bisher nicht ermittelt. Es existieren bereits Erkennungsmethoden auf der Basis von Antikörpern, die jedoch komplex und kostspielig sind [Thanzeel, 2017]. Eine allgemeingültige Methode und Prinzipien zur Detektion sind für *D*-Aminosäuren bisher nicht bekannt. In der Natur existiert ein spezifischer Nachweis von *D*-Aminosäuren aufgrund ihrer Funktion in Peptiden. So gibt es beispielsweise Enzyme, die *D*-Aminosäuren in Peptiden erkennen und nach Ihnen spalten können. Dies wurde am Beispiel von *D*-Aspartat nachgewiesen, dass in den Proteinen der Augenlinse bei Katarakten vorkommt. Dort bewirkt *D*-Aspartat eine Fehlfaltung der Proteine und damit deren Ausfällung. Dadurch entsteht die typische Trübung der Augenlinse. Im Jahr 2015 gelang die erste Hydrolyse dieses Proteins mit *D*-Aspartat durch ein Enzym namens Paenidase [Maeda et al, 2015], [Takahashi et al, 2006]. Paenidase ist bisher das einzige Enzym, das *D*-Aminosäuren spezifisch erkennen und hydrolysieren kann. Auf der Grundlage dieser Forschung ist es möglich, dass andere *D*-stereospezifische Enzyme existieren, die ebenfalls mit *D*-Aminosäuren interagieren.

1.2 *D*-Hydrolasen

1.2.1 *D*-Aminosäure-erkennende Proteine

Die Existenz natürlicher Peptide und Proteine mit *D*-Aminosäuren bedeutet, dass es auch Enzyme geben muss, welche diese umsetzen können. Es existieren in Eukaryoten zwei solcher Enzymgruppen, die Untergruppen der Isomerasen darstellen [Genchi, 2017]. Epimerasen und Racemasen katalysieren die Konfiguration von Aminosäuren und verändern so die biologische Akzeptanz solcher Substrate [Genchi, 2017]. Beispielsweise oxidiert *D*-Aminosäureoxidase (*DAAO*) *D*-Aminosäuren zu α -Ketosäuren und macht sie so für den Stoffwechsel verfügbar [Krebs, 1935], [D'Aniello et al, 1993]. In vielen eukaryotischen Organismen kommt *DAAO* vor [Pollegioni et al, 2007]. Die analoge Oxidation von *D*-Aminosäuren in Bakterien erfolgt durch *D*-Aminosäurehydrogenase [Pollegioni et. al, 2007].

1.2.2 *D*-Peptidasen und *D*-Hydrolasen

Hydrolasen und Peptidasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen. Dabei erfolgt in wässriger Umgebung ein nukleophiler Angriff auf die Peptidbindung. Die alkalische *D*-Peptidase (*ADP*) war die erste *D*-stereospezifische Protease, die 1996 entdeckt wurde und Endopeptidase-Aktivität besitzt [Asano et al, 1996]. Auf Basis der *ADP*-Primärsequenz wurde die *D*-stereospezifische Hydrolase 1 aus *Bacillus thuringensis*

isoliert und charakterisiert [Simon, 2021]. Sie besitzt eine hohe Spezifität für aromatische *D*-Aminosäuren, wie z.B. *D*-Phenylalanin, dem gegenüber ist ihre Aktivität für *L*-Aminosäuren stark reduziert [Lössl, 2010]. Auf Grundlage der ADP und DHy1 wurde drei weitere *D*-stereospezifische Hydrolasen, die DHys2-4, isoliert und charakterisiert [Simon, Liebscher, 2019], [Jähnert, 2015], [Simon, 2021], [Becker, 2013]. Diese DHys sind Serinpeptidasen. Der namensgebende katalytische Rest, Serin, befindet sich im aktiven Zentrum. DHys könnten für den diagnostischen Einsatz bei *D*-Aminosäure-haltigen Proteinen geeignet sein, was jedoch einen Modellversuch erfordert [Hartig, 2018], [Pöttgen, 2019]. Aufgrund des ungewollten Einbaus von *D*-Aminosäuren in Peptide oder Proteine ist eine schnelle Diagnostik dieser erstrebenswert. Um die Grenzen und den Einsatz von DHys zu testen, sollte ein Modellsystem geschaffen werden, das definierte *D*-Aminosäuren enthält. Bei diesem Modell sollte es sich vorzugsweise um ein nahezu natürliches Protein handeln, so die in vivo-Verwendung von DHys simuliert werden kann.

1.3 Parvulin 10 als Modellsystem

1.3.1 PPIasenfamilie – Parvuline

Als Modell für die Validierung von DHys diene Parvulin 10, eine cis/trans-Isomerase aus der Gruppe der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen). Diese katalysieren die cis/trans-Isomerisierung von prolinhaltigen Peptidbindungen. [Hennig et al, 1998]. Parvuline sind an vielen Stoffwechsel- und Signalwegen beteiligt und regulieren Phosphoproteine im Zellzyklus, indem sie cis/trans-Isomerisierungen von pSer-Pro- und pThr-Pro-haltigen Verbindungen katalysieren [Rahfeld et al, 1994], [Ryo et al, 2003]. Die Reaktionsmechanismen der Parvulin-katalysierten PPIasereaktion sind weitestgehend unbekannt. Bisherige Forschungen mithilfe von Mutationen, Spektroskopie und Inhibitoren deuten darauf hin, dass bestimmte Aminosäureseitenketten für die Katalyse wesentlich sind. Ein allgemeiner Reaktionsmechanismus ist nicht formulierbar [Fischer et al, 1984], [Diessner, 2016]. Es wird vermutet, dass ein Serin oder Cystein des Parvulins das Carbonylkohlenstoffatom der Peptidyl-Prolyl-Bindung nukleophil angreift, was zur Bildung von tetraedrigen Zwischenprodukten führt. Solche Annahmen wurden bisher nicht bestätigt [Yaffe et al, 1997], [Landrieu et al, 2002].

1.3.2 Parvulin 10

Zur Parvulin-Familie gehört das prokaryotische Parvulin 10 aus *E. coli*, das als Modell für die Validierung der DHys verwendet wird. Dieses Enzym ist mit 92 Aminosäuren und einer

Größe von 10,1 kDa ein kleines Protein [URL1] [Rahfeld et al, 1994]. Das kleinste Enzym (2-Hydroxymuconat-Tautomerase) besitzt eine Größe von 6,8 kDa oder 62 Aminosäuren [Chen et al, 1992]. Dagegen ist das größte bekannte Enzym mit 273,3 kDa oder 2510 Aminosäuren die humane Fettsäure-Synthase [Jayakumar et al, 1995]. Parvulin 10 agiert als aktives Monomer [Rahfeld, Rücknagel et al, 1994]. Es stabilisiert Proteine und induziert bei Stress deren Faltung im Zellplasma von *E.coli* [Rahfeld et al, 1994]. Es dient nicht nur bei prolylhaltigen Proteinen als Faltungshelfer, sondern katalysiert auch seine eigene Faltung. Dennoch erfolgte 1984 die Entwicklung eines Aktivitäts-Assays [Fischer et al, 1984]. Ein Aktivitäts-Assay für das Enzym wurde 1984 entwickelt. Parvulin 10 hat eine einzige katalytische Domäne und benötigt keine Cofaktoren für die Substratumwandlung; es ist in allen Parvulinen konserviert und stellt somit einen Archetyp der gesamten Parvulinfamilie dar [Kuhlewein et al, 2004], [Scholz et al, 1997],

1.3.3 Modellsystem Parvulin 10 der AG Naturstoffbiochemie

Modifiziertes Parvulin wurde aufgrund seiner geringen Größe, die die Synthese erleichtert und eine Selbstfaltung ermöglicht (siehe 1.3.2), als Modellsystem verwendet. Seine Aktivität kann durch den Aktivitätsnachweis nach FISCHER überprüft werden [Fischer, 1984]. Für die Evaluierung der stereospezifischen *D*-Hydrolasen wurden verschiedene Parvulinderivate hergestellt, die sich durch die Substitution einer *D*-Aminosäure unterscheiden. Aufgrund der Verwendung nicht-kanonischer Aminosäuren war es nicht möglich, Parvulin 10 in biologischen Expressionssystemen zu synthetisieren. Aufgrund der Längenlimitation der Festphasenpeptidsynthese (*Solid-Phase Peptide Synthesis*) (siehe 1.5) kann dieses nicht vollsynthetisiert werden. Daher wird das Derivat in zwei Fragmenten synthetisiert und mittels nativer chemischer Ligation (NCL) das vollständige Enzym generiert.

***N*-terminales Thioester-Fragment (1-67)**

Das *N*-terminale Fragment von Parvulin 10 weist keine Aminosäuresubstitutionen auf. Das All-*L*-Peptid wird an einer Intein-Chitin-Bindungsdomäne von *E. coli* exprimiert und anschließend durch modifiziertes Proteinspleißen in einen Thioester umgebaut. Durch das Spleißen in wässriger Lösung kann es zu Hydrolyse des Thioesters und dem entstehen freier Säure kommen (Tab. A).

Tabelle A: *N*-terminale Fragment Sequenzen (1-67) mit Molekularen Massen

<i>N</i> -terminales Fragment	Sequenz	Molekulare Masse [Da]
Freie Säure	AKTAAALHIL VKEEKLALDL LEQIKNGADF GKLAKKHSIC PSGKRGGDLG EFRQGMVPA FDKVVFS	7222
Thioester + Na ⁺ + H ₂ O	AKTAAALHIL VKEEKLALDL LEQIKNGADF GKLAKKHSIC PSGKRGGDLG EFRQGMVPA FDKVVFS + Na ⁺ + H ₂ O	7347

C-terminales Peptid-Fragment (68-92)

In das *C*-terminale Fragment des Proteins werden *D*-Aminosäuren durch Substitution eingefügt. Es entstehen drei Derivate, die sich jeweils um eine *D*-Aminosäure unterscheiden (Tab. B). Das Peptid wird per SPPS generiert und anschließend mit *DHys* hydrolysiert, um die prinzipielle Zugänglichkeit der *D*-Aminosäuren zu bestätigen.

Tabelle B: *C*-terminale Peptidsequenzen mit markierter Substitutionsstelle

<i>C</i> -terminales Fragment	Sequenz	Substitutionsstelle	Theoretische Molekulare Massen [M + H] ⁺
Wildtyp	CP VLEPTGPLHT QFGYHIKVL YRN	Keine – all-L	2897
Pf	CP VLEPTGPLHT Q ^f GYHIKVL YRN	F14f	2897
Py	CP VLEPTGPLHT QFG ^y HIKVL YRN	Y16y	2897
Pv	CP VLEPTGPLHT QFG ^v HIKVL YRN	Y14v	2833

Nach Hydrolyse der Peptide per *D*-Hydrolasen, sollten sich die Fragmente in der UPLC-MS detektieren lassen (Anhang B). Nach Generierung beider Peptidfragmente werden diese mittels NCL miteinander ligiert (1-67 + 68-92) um abschließend verschiedene artifizielle Parvulin 10-Derivate zu erhalten. Diese sollen als Modell für die Validierung des diagnostischen Einsatzes von *D*-stereospezifischen Hydrolasen und Varianten an Proteinen verwendet werden.

1.4 Proteinspleißen

Das *N*-terminale Fragment (1-67) des Proteins wird durch Expression in *E. coli* hergestellt und ist an eine Intein-Chitin-Bindungsdomäne gebunden. Der Thioester wird anschließend durch Affinitätschromatographie mittels Proteinspleißen erzeugt, einer posttranslationalen Modifikation, bei der Peptidfragmente durch Heraustrennen eines Inteins zwischen zwei Exteinen verbunden werden. [Perler et al, 1997]. Der Reaktionsmechanismus verläuft sehr schnell in vier Schritten ab [Perler, 2005]. Durch eine *S-N*-Acyl-Umlagerung des *N*-terminalen Nucleophils Cystein, Threonin oder Serin wird ein lineares Thioesterintermediat gebildet, das die Peptidbindung an der *N*-terminalen Spaltstelle in eine Esterbindung

umwandelt [Saleh et al, 2006], [Perler, 2005]. Im zweiten Schritt erfolgt eine Spaltung vom Intein und die Übertragung des *N*-Exteins zum *C*-Extein, es entsteht ein verzweigtes Thioesterintermediat. Das *C*-terminale Asparagin wird zyklisiert und löst den verzweigten Thioester vom Intein. Im letzten Schritt hydrolysiert das Aminosuccinimid und es erfolgt eine weitere *S-N*-Acyl-Umlagerung, die eine Peptidbindung zwischen den Exteinen ausbildet [Saleh et al, 2006], [Perler, 2005]. Während der Bildung des Thioesters wird das *C*-terminale Asparagin durch Alanin ersetzt, um einen Komplex aus Intein und Chitinbindungsdomäne zu bilden, der die automatische Spleißaktivität verhindert. Dennoch bleibt die *S-N*-Umlagerung des *N*-terminalen Nucleophils des Inteins, und damit die Bildung des Thioesters, erhalten. Dies ermöglicht die Zugabe definierter Thiole für eine rekombinante Herstellung von Peptid-Thioestern. Der Prozess findet in wässriger Lösung statt, so dass durch Hydrolyse freie Peptide entstehen können.

1.5 Festphasenpeptidsynthese (SPPS)

Das *C*-terminale Fragment des Parvulin-Derivates wird durch SPPS generiert. Die Peptidbindung wird durch einen nucleophilen Angriff der Aminogruppe der ersten Aminosäure auf die Carboxylatgruppe der zweiten Aminosäure gebildet. Aufgrund der geringen Eigenaktivität der Carboxylatgruppe muss diese aktiviert werden. Unbeteiligte funktionelle Gruppen müssen vorübergehend blockiert werden, um einen Mangel an Regio- und Stereoselektivität während der Reaktion zu vermeiden. [Kent, 1988]. Die zweite Aminosäure wird *N*-terminal durch eine Schutzgruppe blockiert, um unerwünschte lineare oder zyklische Peptide zu vermeiden [Sewald et al, 2009]. Die reaktiven Seitenketten einiger Aminosäuren müssen ebenfalls blockiert werden, um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden. [Rentzsch, 2008]. 1963 führte Merrifield die Peptidsynthese auf Polymerträgern ein, die eine automatisierte Synthese von Peptiden vom *C*- zum *N*-Terminus ermöglicht. [Merrifield, 1963]. Eine Aminosäure wird *C*-terminal per Linker kovalent an eine polymere Matrix gebunden. Danach erfolgt die eigentliche Peptidsynthese. Diese erfolgt schrittweise durch Anknüpfung der geschützten Aminosäure und der nachfolgenden Abspaltung der Schutzgruppe (Anhang A1). Mit SPPS können nicht-kanonische und kanonische sowie artifizielle Aminosäurederivate in Peptide eingebaut werden [Sewald et al, 2009], [Merrifield, 1963]. Es ist möglich, ganze Peptide aus artifiziellen Aminosäuren zu generieren, aber auch einzelne *D*-Aminosäuren können eingebaut werden. Die maximale Länge von Peptiden, die vollsynthetisch generiert werden können, beträgt 60 Aminosäuren, was die Verwendung der Methode für Proteinsynthesen einschränkt [Baca et al, 1995].

1.6 Natürlich chemische Ligation (NCL)

Nachdem beide Fragmente durch Proteinspleißen und SPPS generiert wurden, sollen diese per chemoselektivem Ligationsverfahren miteinander verknüpft werden. Dabei bietet sich die NCL und die Staudinger-Ligation an [Dawson et al, 1994], [Köhn et al, 2004]. Die am häufigsten verwendete Methode ist die NCL. Ihre Vorteile liegen bei den milden Reaktionsbedingungen, hohen Ausbeuten und den einfachen Eduktansprüchen [Dawson et al, 1994]. Herausfordernd ist die Synthese des Thioesters und die gezwungene Anwendung des *N*-terminalen Cysteins. Mechanistisch besteht die NCL aus einer Kupplung des *N*-terminalen Thioesters mit der *C*-terminalen freien Cysteinseitenkette des zweiten Peptides in wässriger Lösung [Dawson et al, 1994]. Dabei laufen zwei Vorgänge ab. Im ersten Schritt wird das Carbonyl-*C*-Atom des Thioesters nukleophil von der Thiolgruppe des Cysteins angegriffen und bildet durch Umesterung ein Intermediat. Anschließend erfolgt ein Angriff der Aminogruppe des Cysteins auf das Carbonyl-*C*-Atom. Durch diese *S*-*N*-Umlagerung des Thioesterintermediates bildet sich eine stabile Peptidbindung zwischen den beiden Edukten (Anhang A2) [Dawson et al, 2000]. Limitiert ist dieser Prozess durch die essentielle Rückfaltung des Ligationsproduktes um aktive Proteine zu erhalten [Liebscher, 2008]. Da an jeder freien Sulfhydrylgruppe der Reaktanten eine Umesterung stattfinden kann, führt dies zu unerwünschten Nebenprodukten.

Tabelle C: Sequenz ligierten Parvulin-Derivate mit Substitutionstelle

Protein	Sequenz	Substitutionstelle
Wildtyp	AKTAAALHIL VKEEKLALDL LEQIKNGADF GKLAKKHSIC PSGKRGGDLG EFRQGQMVPA FDKVVFSCP VLEPTGPLHT QFGYHI IKVL YRN	Keine – all- <i>L</i> - Peptid
Pf	AKTAAALHIL VKEEKLALDL LEQIKNGADF GKLAKKHSIC PSGKRGGDLG EFRQGQMVPA FDKVVFSCP VLEPTGPLHT QfGYHI IKVL YRN	F81f
Py	AKTAAALHIL VKEEKLALDL LEQIKNGADF GKLAKKHSIC PSGKRGGDLG EFRQGQMVPA FDKVVFSCP VLEPTGPLHT QFGyHI IKVL YRN	Y83y
Pv	AKTAAALHIL VKEEKLALDL LEQIKNGADF GKLAKKHSIC PSGKRGGDLG EFRQGQMVPA FDKVVFSCP VLEPTGPLHT QFGvHI IKVL YRN	Y83v

Substitutionsstellen: rot; Peptid-Thioester: schwarz; per SPPS synthetisierte Peptid: grün.

Nach der NCL sollen folgende Parvulin 10-Derivate entstanden sein (Tab. C). Diese Modell-Parvuline sollen auf ihre Funktionalität untersucht werden. Diese Arbeit soll die prinzipielle Generierung eines *D*-Aminosäure-haltigen Proteins zeigen und die entsprechende Methode zu weiterführenden Arbeiten für die Hydrolyse durch *DHys* zur Verfügung stellen.

2 Zielstellung

Proteinfaltungserkrankungen werden in der neueren Literatur häufig mit dem Vorkommen von *D*-Aminosäuren in Verbindung gebracht. Dies steht im Widerspruch zur natürlichen Proteinbiosynthese, in welcher ausschließlich *L*-Aminosäuren verwendet werden. Über Ursache und Auswirkung ist in diesem Zusammenhang wenig bekannt und deren Untersuchung schwierig. Dies resultiert aus der Herausforderung, *D*-Aminosäuren in Gegenwart der physikochemisch annähernd identischen *L*-Aminosäuren zu detektieren. Als Lösung hierfür könnten sich *D*-Aminosäure-spezifische Hydrolasen herausstellen. Der Einsatz dieser Enzyme muss jedoch vorher validiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit soll daher ein Modellsystem zur Evaluierung dieser *DHys* entwickelt werden. Als Modellprotein sollen hier drei Parvulin 10-Derivate generiert werden. Diese enthalten jeweils eine *L*-Aminosäure zur *D*-Aminosäure substituiert. Die Darstellung erfolgt halbsynthetisch durch zwei Fragmente. Das *N*-terminale Fragment des Parvulines wird mittels Expression aus *E. coli* und anschließendem Proteinspleißens (1-67 → Thioester), sowie das *C*-terminale Fragment per SPPS (68-92 → Peptide Pf, Py, Pv) hergestellt. Anschließend soll eine generelle Verfügbarkeit der Peptide als Substrat für die *DHys*1-4 in einer initialen Hydrolysestudie überprüft werden. Die Fragmente werden nachfolgend per natürlich chemischer Ligation zu Parvulin-Derivaten verknüpft. Das entstandene Derivat wird mittels Reinigungsstrategien gesäubert und soll auf Aktivität überprüft werden. Die artifiziellen Parvuline, beziehungsweise die Methode der Generierung, sollten abschließend für weitere Arbeiten als Modell zur Evaluierung für *D*-stereospezifische Hydrolasen zur Verfügung stehen.

3 Material

3.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren, wenn nicht anders angegeben, kommerziell erhältlich und von höchstem Reinheitsgrad.

Material I: Chemikalien

Name	Abkürzung	Hersteller
Dimethylformamid	DMF	Iris Biotech GmbH
Natriumhydrogencarbonat		Carl Roth GmbH + Co. KG
Dithiothreitol	DTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dimethylsulfoxid	DMSO	Merck KGaA
Trifluoressigsäure	TFA	LGC Standards GmbH
Trichloressigsäure	TCA	Carl Roth GmbH + Co. KG
Acetonitril	ACN	Th. Geyer GmbH + Co. KG
Aceton		Merck KGaA
Formaldehyd		Carl Roth GmbH + Co. KG
Silbernitrat		AppliChem GmbH
Isopropanol		Th. Geyer GmbH + Co. KG
Natriumthiosulfat		AppliChem GmbH
Natriumdihydrogenphosphat		KMF Laborchemie Handels GmbH
Natriumhydroxid		Merck KGaA
Harnstoff/ Urea		AppliChem GmbH
Tetramethylethyldiamid	TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG
Acrylamid	AA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ammoniumpersulfat	APS	Carl Roth GmbH + Co. KG
Tricine		SERVA Electrophoresis GmbH
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris	AppliChem GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumchlorid		AppliChem GmbH
Natrium-2-Mercaptoethansulfonat	MESNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris(2-carboxyethyl) phosphin	TCEP	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumdodecylsulfat	SDS	SERVA Electrophoresis GmbH
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	IPTG	NeoBiotech Co., Ltd.
Guanidinhydrochlorid		Carl Roth GmbH + Co. KG
β -Mercaptoethanol		Carl Roth GmbH + Co. KG
Bromphenolblau		Carl Roth GmbH + Co. KG
4-Mercaptophenylacetic acid	MPAA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

3.2 Puffer

Material II: allgemeine Puffer

Puffer	Reagenzien	pH-Wert	Temperatur
NaHCO ₃	0,5 M NaHCO ₃	8,0	22 °C

NaHPO ₄	0,2 M NaHPO ₄	8,0	22 °C	Sterilfiltration
NCL	0,05 M NaHPO ₄ 3 M Harnstoff 0,002 M TCEP	8,2	22 °C	Sterilfiltrationentgast
2x NCL	0,2 NaHPO ₄ 0,4 M MPAA 0,4 M TCEP	7,5	22 °C	
B2	0,02 M Tris 0,001 M EDTA 0,5 M NaCl	7,2	4 °C	
B4	0,02 M Tris 0,001 M EDTA 0,2 M NaCl 0,06 M MESNA	8,2	4 °C	
Regeneration	0,3 M NaOH			
PPIase-Puffer	0,035 M HEPES	7,8	10 °C	Sterilfiltration (entgasen)

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Material III: Puffer für SDS-Pages

Puffer	Reagenzien	pH-Wert	Temperatur
10x SDS-PAGE-Laufpuffer	1,9 M Glycin 0,25 M Tris 0,25 M HCl 3,468 M SDS	8,3	22 °C
Trenngelpuffer	1,5 M Tris 1,5 M HCl	8,8	22 °C
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 0,5 M HCl	6,8	22 °C
3x LAEMMLI-Probenpuffer	0,07 M Tris 0,7 M HCl 1,09 M Glycerin 0,17 M SDS 0,64 M β-Mercapto-ethanol 0,05 % Bromphenolblau	6,8	22 °C
Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung	9,36 M Methanol 3,80 M Ethanol 1,67 M Essigsäure 0,20 % (w/v) Coomassie R250 0,05 % (w/v) Coomassie G250		
Entfärbelösung	Essigsäure / Methanol / Wasser 1 / 4,5 / 4,5		

Die 17,5% SDS-Gele wurden nach LAEMMLI [Laemmli, 1970] hergestellt. Proben wurden vor gelelektrophoretischer Trennung mit 3x LAEMMLI-Probenpuffer versetzt und bei 95°C

aufgekocht, wenn nicht anders beschrieben. Durchgeführt wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) bei 30 mA. Die Einfärbung der Gele erfolgte mittels Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung. Entfärbt wurde anschließend mit Entfärbelösung. Alternativ wurde eine Silberfärbung, verändert nach Nesterenko, durchgeführt [Nesterenko et al, 1994].

3.3 Medien

Material IV: Medien

Medium	Konzentration	Reagenzien
LB-Medium	5 % (w/v)	Hefeextrakt
	10 % (w/v)	NaCl
	10 % (w/v)	Pepton
	(in H ₂ O) Autoklaviert	
Ampicilin-Stammlösung	0,286 M (in H ₂ O)	Ampicilin
IPTG-Stammlösung	1 M (in H ₂ O)	IPTG

3.4 Molekularbiologische Reagenzien

Material V: Molekularbiologische Reagenzien

Name	Hersteller	
Ampicilin		C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S
Pepton aus Casein	Th. Geyer GmbH + Co. KG	
Hefeextrakt	SERVA Electrophoresis GmbH	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Page Ruler™ – Unstained Low Range Protein Ladder	ThermoFisher Scientific	3,4 – 100 kDa
Page Ruler™ – Prestained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific	10 – 180 kDa

3.5 Verbrauchsmaterialien

Material VI: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	
Chitinbeads (acetyliertes Chitosan)	New England Biolabs	50 ml
Sterilfilter	Whatman FP30/0.2 CA-S	Porengröße: 0,2 µm Druck: max. 7 bar
Ultrafiltration Products – Vivaspin 6	Sartorius Stedim Biotech GmbH	MWCO 5.000 Volumen: 6 ml
Strata™ -X-C 33 µm Phenomenex	phenomenex	Volumen: 30mg / 1 ml
Polymeric Strong Cation Amicon ^R -Ultra 4	Merck Millipore Ltd.	MWCO 3.000; 10.000
SP HP cation exchange chromatography column	HiTrap	5 ml

3.6 Geräte

Material VII: Geräte

Abkürzung	Gerätenamen	
HPLC (präparativ)	Waters 2545 Binary Gradient Module 2489 UV7Visible Detector Programm: Mass Lynx 4.1 Säule: x select Peptide CSH C18 Prep Column	ACN/ddH ₂ O (0,1 % TFA) 5-100 in 60 min 130 Å 5 µm 19 x 250 mm
RP-HPLC (analytisch)	Agilent 1100 Series Degasser BinPump ALS DAD Programm: Agilent Säulen: Grace VYDAC – Reverse Phase C8 Macherey-Nagel – Nucleodur 100-5 C18ec	ACN/ddH ₂ O (0,1 % TFA)
UV/Vis-Spektrophotometer	Jasco - PTC-423S/15 Julabo - F250 SCINO – S-3100 Programm: LabPro Plus	mit Stickstoffbegasung
UPLC-MS	Waters Acquity UPLC - Column Manager Säule: Waters Acquity UPLC - @BEH C8 Sample Manager – FTN Quaternary Solvent Manager PDA eλ Detector Waters – Micromass Technologies – Q-Tof Premier Programm: Mass Lynx 4.1	ACN/ddH ₂ O (0,05 % FA) 1,7 µm 2,1 x 50 mm
Autoklav	Systemc - VX-150	121° C 15 min
Thermomixer	Eppendorf - ThermoMixer C	25 - 30°C 300 - 550 rpm
Inkubator	Uniequip - Unichromat 1500 Infors - HT Minitron	16°C 37°C 110 rpm
Optische Dichtemessung	Fisher Scientific – Cell density meter model 40	
Zentrifuge	Eppendorf - Centrifuge 5424R	30 s 11000 rpm 20°C
Große Zentrifuge	Beckman Coulter Life	20 min

	Sciences - Avanti J-26 XP Centrifuge Rotor: JLA 8100	4°C 6000 rpm
Ultraschallsonde	G. Heinemann Ultraschall und Labortechnik – Ultraschall Sonfier W-250D	
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter Life Sciences - Optima™ L-90K Ultrazentrifuge Rotor: 70Ti	30 min 35000 rpm 8°C
Kühlschrank	Thermo Scientific – Forma 900 Series	- 80°C
Sterilbank	Labogene – Scanlaf Mars	
Lyophilisation	Christ – Alpha 2-4 LDPlus	- 40°C 0,12 mbar
Zentrifuge (Peptidkonzentration)	Beckman Coulter Life Sciences – Allegra X-30 R- Centrifuge	6-8 °C 6000-7000 rpm Acell / Decell: 9

3.7 Enzyme

Material VIII: Enzyme

Enzym (Wildtypen)	Herkunft	Plasmid	Resistenz	Klonierung	Biosynthese/ Reinigung
DHy1	<i>B. thr.</i>	pET 30a+	Kan	A. Simon	A. Simon
DHy2	<i>B. thr.</i>	pET 30a+	Kan	L. Hartig	L. Hartig
DHy3	<i>B. thr.</i>	pET 30a+	Kan	K. Becker	F. Jähnert
DHy4	<i>B. thr.</i>	pET 30a+	Kan	K. Becker	L. Hartig
pbp5	<i>B. thr.</i>	pET 30a+	Kan	J. Müller	J. Müller

3.8 *E. coli* - Stamm

Material IX: *E. coli*-Stamm

Plasmid	Genname des Inserts	Schnittstellen	<i>E. coli</i> - Stamm	Erhaltenes Protein	Herkunft
pTWIN2 ¹	ppiC	NdeI, SapI	ER2566 ^{1,2}	<i>E. coli</i> Par10 1-67-Intein	hausteigene Stammsammlung

¹New England Biolabs

²Genotyp ER2566

F- λ -*fhuA2* [*Ion*] *ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11* Δ (*mcrC-mrr*) 114::*IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]*

4 Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurden die nachfolgenden Methoden bei Raumtemperatur durchgeführt.

4.1 Synthese der Par10-Derivate

4.1.1 Intein-vermittelte Synthese des *N*-terminalen-Fragmentes als Thioester

Begleitende Analytik

Einzelne Proben wurden in der UPLC-MS analysiert. Hierfür wurden Proben in 30 % Essigsäure gelöst. Als Laufmittelsystem wurde ACN/ddH₂O (0,05 % FA) verwendet. Für die Auswertung wurde MassLynx 4.1 genutzt. Um eine erfolgreiche Reinigung zu bestätigen, wurden Proben von verschiedenen Chromatographieschritten gesammelt und mit 3x LAEMMLI-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Analyse dieser Proben erfolgte mittels SDS-Page [Laemmli, 1970].

Expression Par10 (1-67) als Intein

Die Expression des Par10-Fragmentes als Intein erfolgte im *E. coli* Zellstamm ER2566. Hierfür wurde eine Vorkultur (50 ml LB-Medium; 50 µl Ampicillin (0,286 M); *E. coli* (ER2566) angefertigt. Diese wurde jeweils 24 Stunden bei 16 °C und 37 °C inkubiert. Das LB-Medium wurde mit der Vorkultur (1 l LB-Medium; 1 ml Ampicillin (0,286 M); 20 ml Vorkultur) angesetzt. Es wurde bei 37 °C und 110 rpm inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,9 erreicht war. Es erfolgte die Induktion mit 500 µM IPTG für 16 Stunden bei 16 °C.

Zellernte und Zellaufschluss

Die *E. coli*-Kultur wurde 20 Minuten bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellsediment wurde bei 4 °C in 160 ml B2-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mithilfe von Sonifikation (Schallzeit: 1 min; Amplitude: 40,00 %; Puls: 15 s; Pause: 40 s; Anzahl Pulswiederholungen: 6x). Unlösliche Bestandteile wurden sedimentiert (90000 x g; 30 min; 8 °C). Der Überstand wurde vereinigt und affinitätschromatographisch gereinigt.

Reinigung des Par10-Inteins durch Affinitätschromatographie

Die Reinigung des Par10-Inteins und das Überführen in den Thioester erfolgte bei 8 °C mit einer Säule aus Chitinbeads (acetyliertes Chitosan) anhand der Tabelle D.

Tabelle D: Schema der Durchführung der Affinitätschromatographie für die Generierung des Thioester

Schritt	Name	Puffer / Lösung	Durchfluss in ml
1	Äquilibrierung	B2-Puffer	200
2	Beladung	Überstand	~ 160
3	Waschen	B2-Puffer	500
4	Eluieren	B4-Puffer	100
5		Wartezeit ~ 12 Stunden	
6		B4-Puffer	100
7	Regeneration	0,3 M NaOH	150
8		30 Minuten Wartezeit	
9		0,3 M NaOH	350
10		dd H ₂ O	1000
11		B2-Puffer	250

pH 7,2

Reinigung Thioester

Die Reinigung des Thioesters erfolgte mithilfe einer präparativen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Das Laufmittelsystem bestand aus ACN/ddH₂O (0,1 % TFA) (Gradient: 5-100 in 5 min). Ausgewertet wurde mit der Software MassLynx 4.1.

4.1.2 Synthese der C-terminalen Par10-Fragmente (68-92)

Die mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellten Par10-Fragmente (68-92) wurden von Dr. rer. nat. Lars Franke zur Verfügung gestellt.

4.1.3 Reinigung der C-terminalen Par10-Fragmente per präparativer HPLC

Reduktionsansätze

Für die Reinigung des Par10-Fragmentes (68-92) wurden etwa 100 mg lyophilisiertes Peptid in 1:1 DMF und NaHCO₃-Puffer gelöst. Dazu wurden 4-5 Äquivalente 1 M DTT hinzugegeben. Die Lösung wurde, bis eine homogene Lösung entstand, durchmischt und auf pH 8 eingestellt.

präparative HPLC

Die Reinigung des Reduktionsansatzes erfolgte an der präparativen HPLC (siehe 3.6). Als Laufmittelsystem wurden ACN/ddH₂O (0,1 % TFA) (Gradient: 5-100 in 60 min) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit MassLynx 4.1. Die Kontrolle der Aufreinigung erfolgte per UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Hierfür wurden die Peptidlösungen in 30 % Essigsäure gelöst. Als Laufmittelsystem wurde ACN/ddH₂O (0,1 % TFA) verwendet. Das

Molekulargewicht jeder Peptidvariante wurde theoretisch bestimmt und mit den ermittelten Werten der UPLC-MS abgeglichen. Eventuelle Abweichungen der ermittelten Molekulargewichte wurden berücksichtigt. Das gereinigte Peptid wurde lyophilisiert.

4.2 Initiale Hydrolysestudie

Um eine generelle Spaltungsfähigkeit der *D*-Hydrolasen an den *D*-Aminosäuren der Peptide nachzuweisen, wurde ein Testverdau durchgeführt. Hierzu wurden die Massen der theoretischen Spaltprodukte berechnet. Es wurde jeweils für die Peptide und Enzyme ein Hydrolyseansatz (0,1 M NaHPO₄; 100 µM Peptid; 1 µM Enzym) angefertigt. Diese wurden bei pH 8, 30 °C und 550 rpm inkubiert. Referenzwerte wurden vor Enzymzugabe und direkt nach Enzymzugaben genommen. Proben wurden im Zeitraum von 30 bis 150 Minuten nach Enzymzugabe entnommen. Die Analytik erfolgte mittels UPLC-MS (siehe 3.6). Hierfür wurden die Peptidlösungen in 30 % Essigsäure gelöst. Als Laufmittelsystem wurde ACN/ddH₂O (0,05 % FA) verwendet (Gradient: 5-100 in 5 min).

4.3 Natürlich chemische Ligation (NCL)

Die NCL wurde verwendet, um den Peptid- α -Thioester (Par10 1-67) mit dem *N*-terminal Cystein-enthaltenden Peptid (Par10 68-92) unter Ausbildung einer nativen Peptidbindung zu verknüpfen. Hierfür wurden die Ligationsansätze bei 25 °C und 300 rpm durchgeführt. Der pH-Wert der Ansätze befand sich zwischen 7,0-8,0. Die Zusammensetzung der Ligationsansätze befindet sich in Tabelle E.

Tabelle E: Zusammensetzung der Ligationsansätze

Peptid	Thioester	Thiol	
1 mM	1 mM	Thiophenol 0,5 %	in NCL-Puffer
1 mM	2 mM		
1 mM	3 mM		
1 mM	5 mM		
1 mM	1 mM		
2 mM	1 mM		
3 mM	1 mM		
5 mM	1 mM		
1 mM	1 mM	Thiophenol 0,5 %	in NCL-Puffer
2 mM	1 mM		
3 mM	1 mM		
1 mM	1 mM		in Guanidin (6 M)
2 mM	1 mM		
3 mM	1 mM		
1 mM	1 mM		in Urea (10 M)
2 mM	1 mM		

3 mM	1 mM		
1 mM	3 mM	Thiophenol 0,5 %	DMF
3 mM	1 mM		
1 mM	3 mM	MPAA (Spatelspitze)	
3 mM	1 mM		
1 mM	3 mM	Thiophenol 0,5 %	TFE
3 mM	1 mM		
1 mM	3 mM	MPAA (Spatelspitze)	
3 mM	1 mM		
1 mM	3 mM	Thiophenol 0,5 %	1:0,6 DMF und NCL- Puffer
1 mM	3 mM		2,5:1 DMSO und NCL-Puffer

Ansatzgröße: 100 µl.

Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, mit 3x LAEMMLI-Puffer [Laemmli, 1970] versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Analyse dieser Proben erfolgte mittels SDS-Page nach LAEMMLI.

4.4 Reinigungsstrategien der Ligationsansätze

Die Analytik der Reinigungsversuche erfolgte mittels SDS-Page (Siehe 3.2)

4.4.1 Trennung nach Molekulargewicht / Molekularvolumen

Der Ligationsansatz wurde bei 4000 x g mit einer Amicon^R-Filtereinheit (*Cut off*: 3000 MW) mit schrittweiser Zugabe von 10 ml NCL-Puffer für 90 min zentrifugiert.

4.4.2 Trennung nach Polaren Wechselwirkungen

Der Ligationansatz wurde 1:20 mit 5 mM HEPES (pH 8,2) verdünnt. Die Säule des Kationenaustauscher wurde nach den Schritten in Tabelle F behandelt.

Tabelle F: Ablauf der Kationenaustauschchromatographie

Schritt	Name	Lösung	Volumen
1	Äquilibrieren	10 mM HEPES	200 µl
2	Waschen	10 mM HEPES	600 µl
3	Probe auftragen	Probe: 1/20 verdünnt mit 5 mM HEPES	
4	Waschen	10 mM HEPES	600 µl
5	Elutionsschritte	<u>10 mM HEPES</u>	
		50 mM NaCl	1000 µl
		100 mM NaCl	1000 µl
		200 mM NaCl	1000 µl
		300 mM NaCl	1000 µl
		400 mM NaCl	1000 µl
		500 mM NaCl	1000 µl

Säule: Polymer 33 µm; 30 mg/ ml.

4.4.3 Trennung nach Hydrophobizitäten

Die Trennung an der RP-HPLC erfolgte mithilfe von zwei verschiedenen Säulen. Es wurden von den Ligationsansätzen 90 μl entnommen und 10 μl 30 % Essigsäure hinzugefügt. Davon wurden 90 μl in die HPLC injiziert. Der Gradient der C-18-Säule betrug 0-100 % ACN in 60 Minuten. Bei der C-8-Säule betrug dieser 0 % ACN für 10 min, anschließend 0-70 % ACN in 50 min.

4.5 Aktivitätstestung per PPlase-Assay

Die Messungen erfolgten bei 10 °C. Die Auswertung wurde mittels LabPro Plus und Sigma Plot 14.0 durchgeführt. Es erfolgte jeweils eine Referenzmessung ohne Parvulin. Die Ansätze besaßen eine Größe von 1.500 μl . Die Endkonzentrationen im Messansatz betragen 8 μM α -Chymotrypsin und 25 μM Substrat (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA). Die Konzentration an Parvulin 10 (Wildtyp) wurde schrittweise von 0 bis 6 nM erhöht. Für das Parvulin-Derivat waren die α -Chymotrypsin- und Substratkonzentrationen zur Wildtypmessung identisch. Von dem Parvulin-Derivat wurden schrittweise 0-6 μl eingesetzt.

5 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollen drei verschiedene Parvulin 10 Varianten hergestellt werden. Bei jeder dieser Varianten war jeweils exakt eine *D*-Aminosäure substituiert, um eine enzymatische Spaltung durch *D*-Hydrolasen feststellen zu können (siehe 1.3).

5.1 Synthese der Par10- Varianten

Es wurden drei Peptidvarianten für das *C*-terminale Fragment (68-92), (Pf (F81f); Py (Y83y) und Pv (Y81v)), mittels SPPS hergestellt und anschließend gereinigt.

Das *N*-terminale Fragment (1-67) konnte in *E.coli* (Stamm: ER2556) exprimiert werden und wurde mit Hilfe einer Kombination aus Affinitätschromatographie und Proteinspleißens zum fertigen Produkt umgebaut.

5.1.1 Generierung des *N*-terminalen Par10-Fragmentes (1-67) als Thioester

Das *N*-terminale Par10-Fragment wurde in dem *E. coli* (Stamm: ER2566) als Thioester fusioniert an eine Intein-Chitin-Bindedomäne exprimiert. Den Erfolg der Expression ist durch den Vergleich der Anwesenheit einer Bande für die Intein-Chitin-Bindedomäne vor Induktion (o.IPTG) und nach Zellaufschluss (n.Z.) zu erkennen (Abb. 1). Hier zeigt sich die erfolgreiche Expression des Peptidfragmentes (1-67). Die Intein-Chitin-Bindedomäne mit Thioester (1-67) besitzt eine Größe von circa 32 kDa. Diese ist in der Probe „o.IPTG“ nicht als eindeutige Bande zu sehen. Im Vergleich hierzu erscheint nach Zellaufschluss (Bande n.Z.) eine eindeutige scharfe Bande bei etwa 32 kDa. In der Zellkultur war nach Induktion also Thioester + Intein vorhanden. Somit konnte die Biosynthese über IPTG erfolgreich eingeleitet werden. Anschließend erfolgte die Umsetzung des Thioesters durch Thiol-vermitteltes (MESNA) Proteinspleißens. Diese Umsetzung wurde mittels UPLC-MS (Anhang 1) bestätigt. Die Elution des Thioesters erfolgte nach Tabelle D. Dabei wurden die Elutionschritte gesammelt und auf ihren Gehalt an Thioester untersucht. Für die qualitative Einschätzung wurde eine SDS-Page angefertigt (Abb. 1). Alle Elutionsschritte zeigen durch die Anwesenheit einer Bande bei etwa 7 kDa an, dass sich Thioester in der Probe befindet. Bei den Elutionen 6a und 6b ist die Konzentration am Höchsten (Abb. 1). Dies ist an der Stärke der Banden zu erkennen. In allen Ansätzen lassen sich unspezifische Nebenprodukte nachweisen. Die Probe, in der nur die Beads aufgetragen wurden, zeigt nur eine Bande. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass dort kein Thioester mit Intein-Chitin-Bindedomäne mehr gebunden war. Somit war die Elution des Thioesters vollständig möglich.

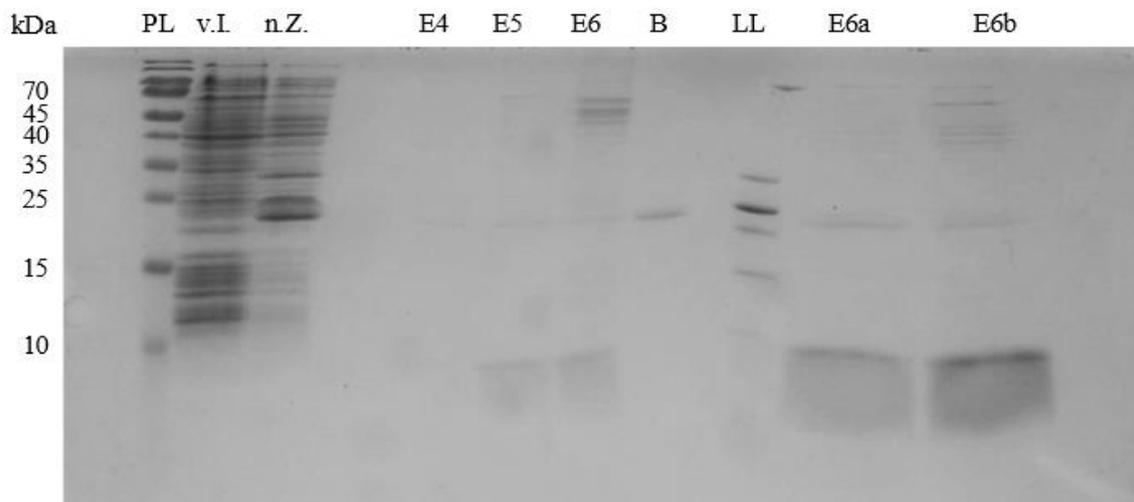


Abbildung 1: SDS-Gel der Synthese des Par10 (1-67).

Das Elektropherogramm (17,5 %-ige SDS-Page gefärbt mit Coomassie) zeigt die Aufreinigung des Par10-Fragmentes mittels Affinitätschromatographie. Protein Ladder (PL): Page Ruler™ – Prestained Protein Ladder (Anhang 5). (LL): Page Ruler™ – Unstained Low Range Protein Ladder. (o. IPTG): *E. coli*-Kultur vor Zugabe von IPTG. (n. Z): Nach Zellaufschluss. (E4-E6): Elutionschritt 4-6.

5.1.2 Synthese und Reinigung der C-terminalen Par10-Fragmente (68-92)

Die Peptide wurden mittels SPPS (siehe 1.5) von Dr. rer. nat. Lars Franke erzeugt und vor der Reinigung mittels UPLC-MS auf ihre Richtigkeit kontrolliert. Somit konnte der Erfolg der Synthese nachgewiesen und auf der Grundlage des Laufmittelverhältnisses eine Abschätzung der Bedingungen für eine Reinigung bestimmt werden. Die Detektionsgrenze liegt bei 2000 m/z, während das Peptid Pf eine berechnete Masse von 2897 m/z besitzt. Dadurch erfolgt im Spektrum eine Auswertung von mehrfach geladenen Spezies. Die theoretisch bestimmten Massen und ihre Ladungen sind in Anhang B1 zu finden. Nach der Durchführung des UPLC-MS des Peptides Pf (F81f) ist festzustellen, dass A) das Peptid in der Lösung vorliegt (Abb. 2). Es können im Chromatogramm und Massenspektrum die berechneten Peptidmassen und unspezifische Nebenprodukte nachgewiesen werden (Abb. 2) (Anhang B1, B2). Diese sind nach der Synthese durch ein Doppelsignal mit kleineren Nebensignalen und einer weiten Streuung zu erkennen (Abb. 2 A)). Auch andere, nicht dem Peptid zugeordnete Signale sind enthalten. Das Doppelsignal liegt bei einer Retentionszeit von 2,33 Minuten (44,27 % ACN) und 2,64 Minuten (50,16 % ACN). Der Erfolg der Reinigung des Peptides mittels präparativer HPLC kann durch UPLC-MS bestätigt werden. Nach der Reinigung erkennt man, dass ein einzelnes Signal im Chromatogramm auftritt. Die UPLC-MS Auswertung (Abb 2 B)) B) ergibt, dass das Peptid nach 53 % ACN (Retentionszeit: 2,64 Minuten) durch das Massenspektrometer detektiert wird (Abb. 2 C)). Das Auftreten eines einzelnen Signals zeigt, dass eine erfolgreiche Aufreinigung möglich ist. Im Massenspektrum C) sind zwei Signale mit einer Intensität über 50 % zu finden. Das Signal bei einem m/z von 724 besitzt eine

Intensität von 100 %. Es kann als $[M + 4 H]^{4+}$ -Signal von Pf zugeordnet werden. Mit einer geringeren Intensität bei etwa 80 % ist das Signal bei einem m/z von 966, welches dem $[M + 3 H]^{3+}$ -Signal entspricht. Der Anteil des m/z von 1448, dem $[M + 2 H]^{2+}$ -Signal zuzuordnen, beträgt etwa 15 %. Es können unspezifische Substanzen im Chromatogramm und Spektrum festgestellt werden. Aufgrund der Detektionsgrenze von 2000 Da, ist die einfach geladenen Spezies (2897 $[M + H]^+$) im Massenspektrum nicht vorzufinden. Die Spektren der Peptide Py und Pv wurden analog zu Pf ausgewertet (Anhang B1; B2). Die zuvor berechneten Massen sind in den Spektren zu finden. Somit war die Synthese und Aufreinigung der Peptide Py mit einer Größe von 2897 Da und Pv mit einer Größe von 2833 Da erfolgreich.

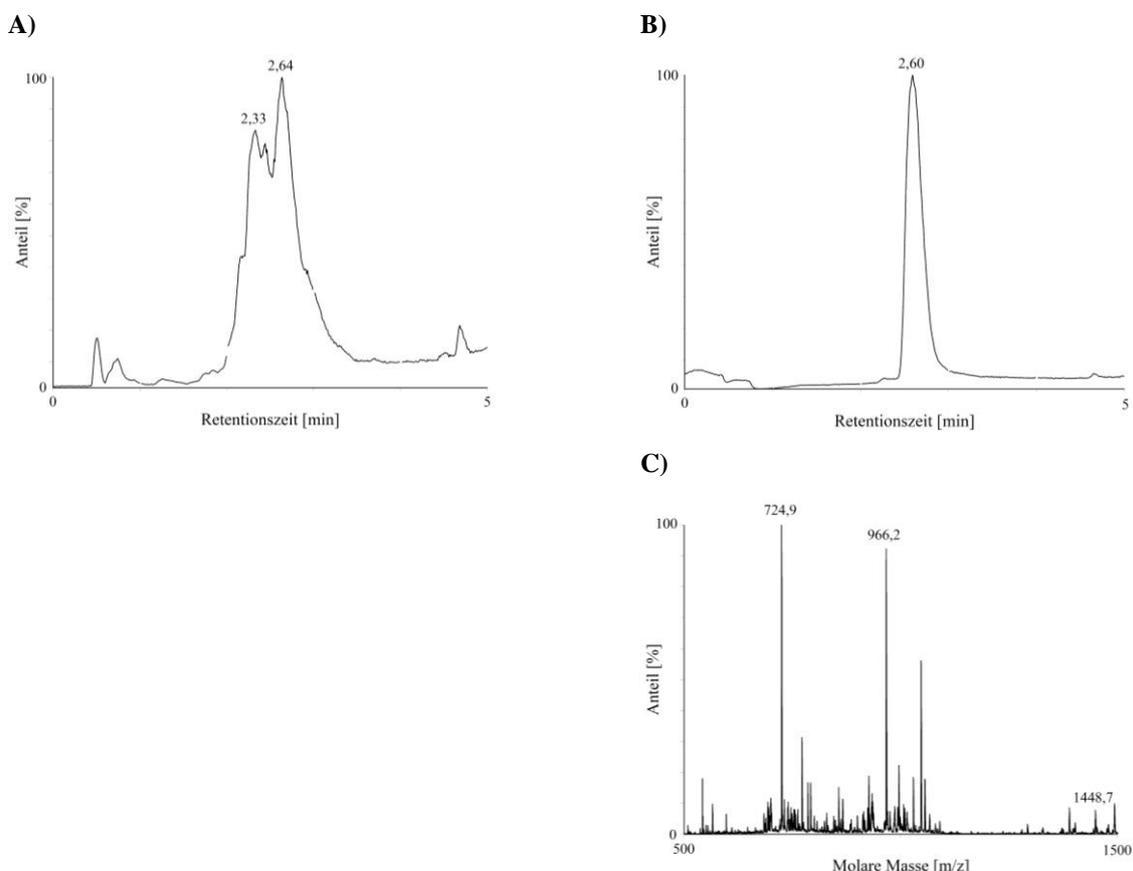


Abbildung 2 UPLC-MS Analyse und Reinigung des synthetisierten Peptides Pf.

Abgebildet sind die Chromatogramme des Peptides Pf vor und nach der Reinigung der HPLC. Zusätzlich sind die Massen des Peptides nach der Reinigung im Massenspektrum aufgezeigt. A) Chromatogramm: Auftragung der relativen Häufigkeit der Massen (%) gegen die Zeit (min) von Peptid Pf vor der präparativen HPLC. B) Chromatogramm: Auftragung der relativen Häufigkeit der Massen (%) gegen die Zeit (min) von Peptid Pf nach der präparativen HPLC. C) Massenspektrum: Auftragung der relativen Häufigkeit (%) der Massen gegen das Ladungsmasseverhältnis (m/z) des Peptides Pf nach der Reinigung mittels präparativer HPLC. Messbedingungen: UPLC-MS – Säule: Waters Acquity UPLC-@BEH C8; 220 nm, 420 nm; Lösungsmittelgradienten 5-100 % ACN/H₂O (0,1 % TFA); 5 min; 0,3 ml/min; 30 °C.

5.2 Initiale Hydrolysestudie

Die Auswertung der Hydrolysestudie erfolgte über UPLC-MS. Vorhersagen über die Hydrolyse der Peptide konnten tendenziell bestätigt werden (Tab. G), (Anhang B3). Die

Hydrolase PbP5 wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Pf wurde durch DHy1, 3 und 4 hydrolysiert. Das zeigen der verringerte Gehalt an Edukten und das Auffinden von Hydrolyseprodukten mit geringeren m/z als das Edukt ($689 [M + 2 H]^{2+}$; $770 [M + 2 H]^{2+}$; $1539 [M + H]^+$) in den Massenspektren. Beim Enzymverdau mit DHy2 wurden keine zusätzlichen Signale durch die UPLC-MS nachgewiesen. Dies gilt ebenso für die Hydrolase PbP5. Außerdem war der Gehalt an Edukten nach Enzymverdau identisch, mit denen vor der Reaktion (Anhang B3). Somit kann für das Peptid Pf durch DHy1, 3 und 4 eine Hydrolyse stattfinden. Nicht möglich ist dies für die Enzyme DHy2 und PbP5. Nach der Reaktion von Py mit DHy2, 3 und DHy4 kann Produkt (880 und $579 [M + 2 H]^{2+}$) nachgewiesen werden, somit findet hier eine Hydrolyse statt. Gleichmaßen zu den Ergebnissen für Pf, findet auch bei Py keine Hydrolyse durch DHy1 und die Negativkontrolle PbP5 statt. Bei der Verdauung von Pv kam es nur bei DHy1 und 4 zur Hydrolyse. Für DHy4 kann nach Verdau sowohl Edukt ($708 [M + 4 H]^{4+}$; $944 [M + 3 H]^{3+}$), als auch in geringerer Konzentration Produkt ($848 [M + 2 H]^{2+}$) nachgewiesen werden. Alle anderen getesteten Hydrolasen spalten Pv nicht. Der Peptidgehalt vor und nach der Reaktion ist identisch (Anhang B3).

Tabelle G: Hydrolyse der synthetisierten Peptide durch D-Hydrolasen.

dargestellt sind die D-Hydrolasen und ihre Fähigkeit die Peptide Pf, Py und Pv zu hydrolysieren (s. Anhang 2).

Enzym	Hydrolyse		
	Peptid Pf (F81f)	Peptid Py (Y83y)	Peptid Pv (Y83v)
Dhy1	+	-	+
Dhy2	-	+	-
Dhy3	+	+	-
Dhy4	+	+	+
pbp5	-	-	-

30 °C; pH 8; 550 rpm; 1 μ M Enzym; 100 μ M Peptid

5.3 Natürlich chemische Ligation (NCL)

Zur Evaluierung der idealen Reaktionsbedingungen wurden mit Peptid Pf verschiedene Ligationsansätze durchgeführt. Hierbei erfolgte eine Variation in der Parvulin- und der Thioesterkonzentration, sowie die Verwendung verschiedener Puffer und Zusätze. Alle Reaktionen wurden bei 25 °C und 300 rpm durchgeführt. Keine Ligationsreaktion war vollständig. Dies beeinflusst die Produktkonzentration.

5.3.1 Vergleich Parvulin- und Thioesterkonzentration

Um die maximal mögliche Ausbeute der NCL bestimmen zu können, wurde die Konzentration des Thioesters erfasst. Diese ist für die Reaktion der NCL der limitierende Faktor. Um die Konzentration des Thioesters zu berechnen, wurden definierte Konzentrationen Parvulin gegen verschiedene Mengen des Thioesters auf einer SDS-Page

verglichen (Anhang B5). Die Intensität der Banden von 2 μ M Parvulin und 8 μ l einer 2:1 Thioester-Puffer-Verdünnung sind übereinstimmend. Das Verhältnis von Thioestern zur freien Säure wurde per UPLC-MS bestimmt (Abb. 3), da diese nicht auf einer SDS-Page unterschieden werden konnte. Die Größe des Thioesters ist mit 7347 Da zu ähnlich zu seiner freien Säure mit 7222 Da. Dabei beträgt das Verhältnis Thioester/ freie Säure circa 1:0,57. Auf Grundlage dieser Ergebnisse ließ sich eine Konzentration an Thioester in der Stocklösung von 2 μ M ermitteln.

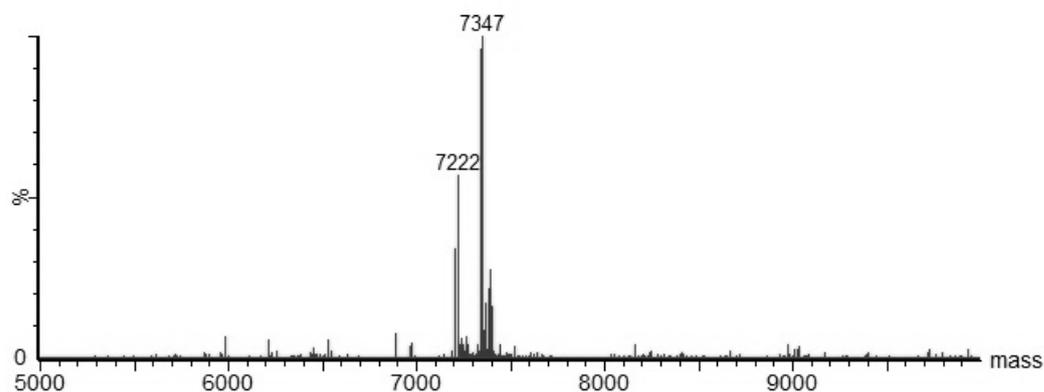


Abbildung 3 Masse des Thioester- freie Säure Verhältnis

Das Massenspektrum zeigt das Verhältnis von Thioester (7347 Da) zu freier Säure (7222 Da), welche durch Hydrolyse des Esters entsteht. Messbedingungen: UPLC-MS – Säule: Waters Acquity UPLC-@BEH C8; 220 nm, 420 nm; Lösungsmittelgradienten 5-100 % ACN/H₂O (0,1 % TFA); 5 min; 0,3 ml/min; 30 °C.

5.3.2 Ligation in NCL-Puffer mit verschiedenen Peptidkonzentrationen

In dieser Ligation wurden die Peptid-Thioesterverhältnisse variiert. Die Auswertung des Ligationsversuches erfolgte mittels SDS-Page (Abb. 4). Die Reaktanten der Ligation kann man auf den Banden 10 kDa (Parvulin-Derivat), 7 kDa (Thioester bzw. dessen freie Säure) und bei circa 3 kDa (Peptid) sehen. Es zeigt sich, dass die Ligation bei Peptid- und Thioesterüberschuss (3 mM) am besten funktionierte, da hier die Bandenstärke bei 10 kDa zunahm. (Abb. 4). Jedoch wird bei zu hohem Überschuss an Thioester oder Peptid (5 mM) kein Parvulin mehr gebildet, die Bandenintensität nimmt ab. Es wurde festgestellt, dass in allen Ansätzen kurz nach Reaktionsbeginn Edukte oder Produkte ausfielen, deshalb ist die Bandenstärke bei 3 und 7 kDa noch stark zu sehen. In allen Ansätzen lassen sich unspezifische Nebenprodukte auf der Höhe von 14,5 kDa nachweisen (Abb. 4). In Thioester enthaltenen Proben ist eine Bande auf 25 kDa zu sehen. Dies ist anscheinend die Intein-Chitin-Bindedomäne, welche durch die Elution der Säule mit heruntergetragen wurde. Dieselbe Bande ist auch bei der Auswertung der Synthese des Thioesters zu finden (Abb. 1).

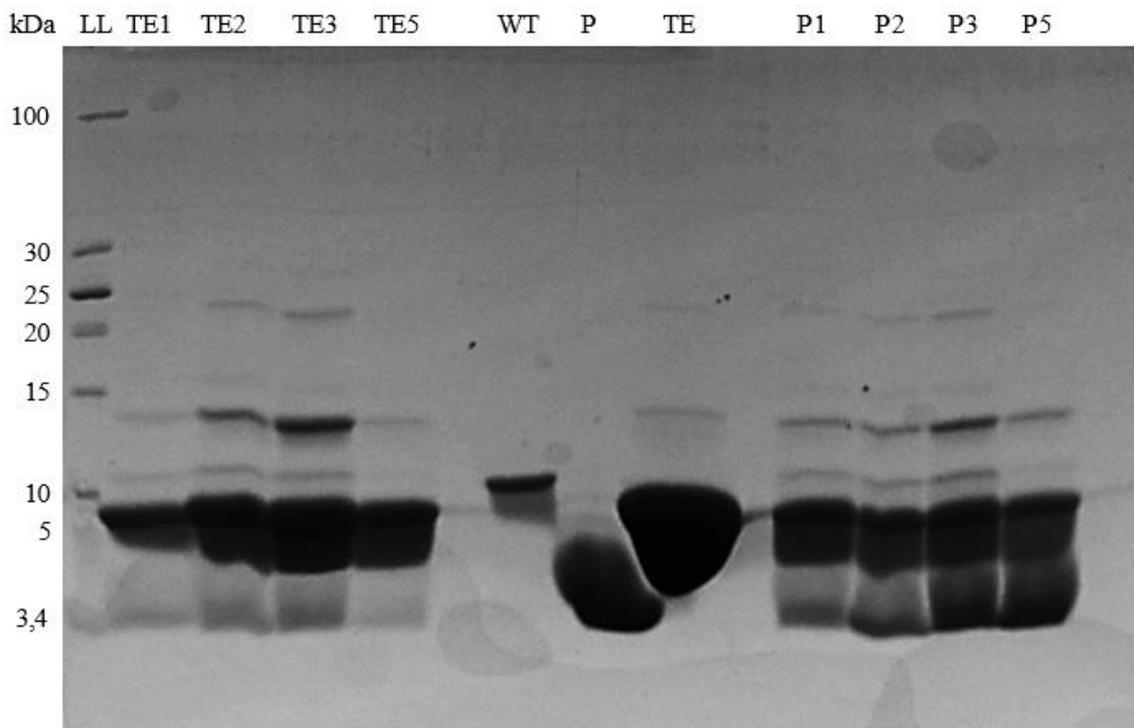


Abbildung 4 SDS-Gel der Ligation des Par10 in NCL-Puffer.

Das Elektropherogramm (17,5 %-ige SDS-Page gefärbt mit Coomassie) zeigt die Ligation der Par10 Fragmente mittels verschiedener Konzentrationen an Peptid und Thioester. Low Ladder (LL): Low Range Protein Ladder (Anhang 5). (WT): Wildtyp Parvulin 10. (P): Peptid Pf (*D*-Phenylalanin). (TE): Thioester. TE 1-5: Peptid 1 mM, Thioester 1-5 mM. P 1-5: Peptid 1-5 mM, Thioester 1 mM

5.3.3 NCL mit verschiedenen Peptidzusätzen und Thiolen

Im Rahmen der Ligation wurden verschiedene Lösungsmittel als Alternative zu NCL-Puffern untersucht. Dabei wurden unter anderem DMF und TFE verwendet. Gleichzeitig wurden auch zwei verschiedene Ester auf ihre Effektivität untersucht. Zum einem Thiophenol, andererseits MPAA (Abb. 5 – T, M). Die Auswertung der Ligation erfolgt mittels SDS-Page (Abb. 5). Ansätze, die sich nur in Lösungsmitteln unterscheiden, zeigen gleiche Bandenintensitäten. Unterschiede werden in F1T und F1M sichtbar. In F1T bildete sich Parvulin, dies erkennt man am Erscheinen bei 10 kDa. Diese beiden Ansätze unterscheiden sich nur in der Zugabe des Thiols. Daher wird die Produktbildung durch die Thiole beeinflusst. Aufgrund der Bandenintensitäten im Gel ist Thiophenol, das bessere Thiol für die Ligation (F1T).

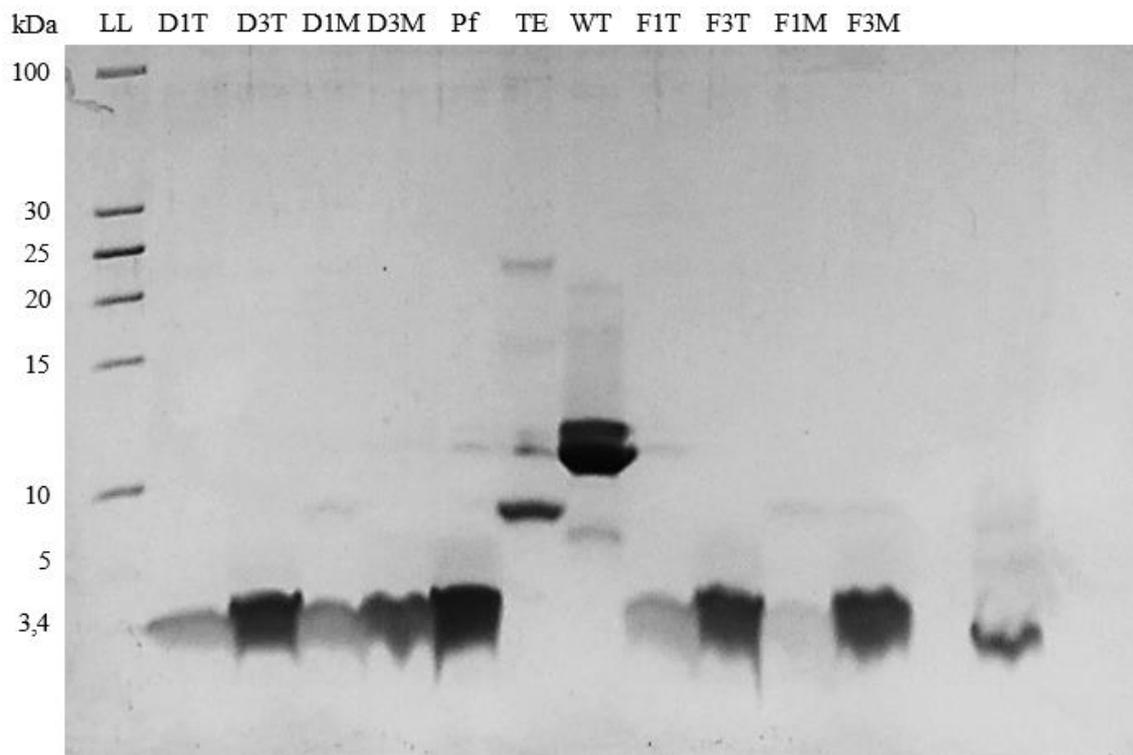


Abbildung 5 SDS-Page der Ligation des Par10 mit NCL-Puffer.

Das Elektropherogramm (Tris/Tricine SDS-Page gefärbt mit Coomassie) zeigt die Ligation der Par10 Fragmente mittels verschiedener Lösungsmittel an. Low Ladder (LL): Page Ruler™ – Unstained Low Range Protein Ladder (Anhang 5). D – DMF; F – TFE; 1 – Pf:TE/1:3; 3 – Pf:TE/3:1; T – Thiophenol; M – MPAA

5.3.4 Ligation mit chaotropen Salzen

Für diese Ligation wurden verschiedene Puffer verwendet (Anhang B6). Die Auswertung erfolgte sowohl per SDS-Page, als auch mit UPLC-MS (Anhang B6). Die SDS-Page zeigte bei keiner Migrationsbande Produkt an. Ausnahme ist die Probe P, welche nur das Peptid selbst beinhaltet. Diese zeigt eine leichte Konzentration von Produkt an. In allen Ansätzen lassen sich unspezifische Nebenprodukte nachweisen. Für die UPLC-MS wurden Proben der 2 mM Peptid Pf Ansätze genommen. Die Auswertung der UPLC-MS (Anhang B6) ergab, dass in keinem der Ligationsansätze Parvulin10 vorhanden war. Thioester wurde nicht aufgefunden. Dimere des Peptides (68-92) ($5792-5795 [M + H]^+$) sind in den Spektren erkennbar. In allen Ansätzen lassen sich unspezifische Nebenprodukte nachweisen.

5.3.5 NCL mit organischen Lösungsmitteln

Um die Löslichkeit der Edukte der NCL zu erhöhen, wurden verschiedene organische Lösungsmittel zugesetzt. Mithilfe einer SDS-Page wurden die Ergebnisse überprüft (Abb. 6). Da sich Reaktanten abgesetzt haben, wurden auch Proben des Überstandes bzw. der abgesetzten Pellets entnommen. Die NCL mit DMF zeigt keine sichtbare Ligationsprodukte an. In der Ligation mit DMSO wird durch eine Bande bei 10 kDa sichtbar, dass sich ein

Parvulin-Derivat gebildet hat. Dieses setzte sich nach einiger Zeit ab und war im Pellet (DMSO-DL) zu finden. In den anderen beiden Fraktionen war kein Produkt auffindbar.

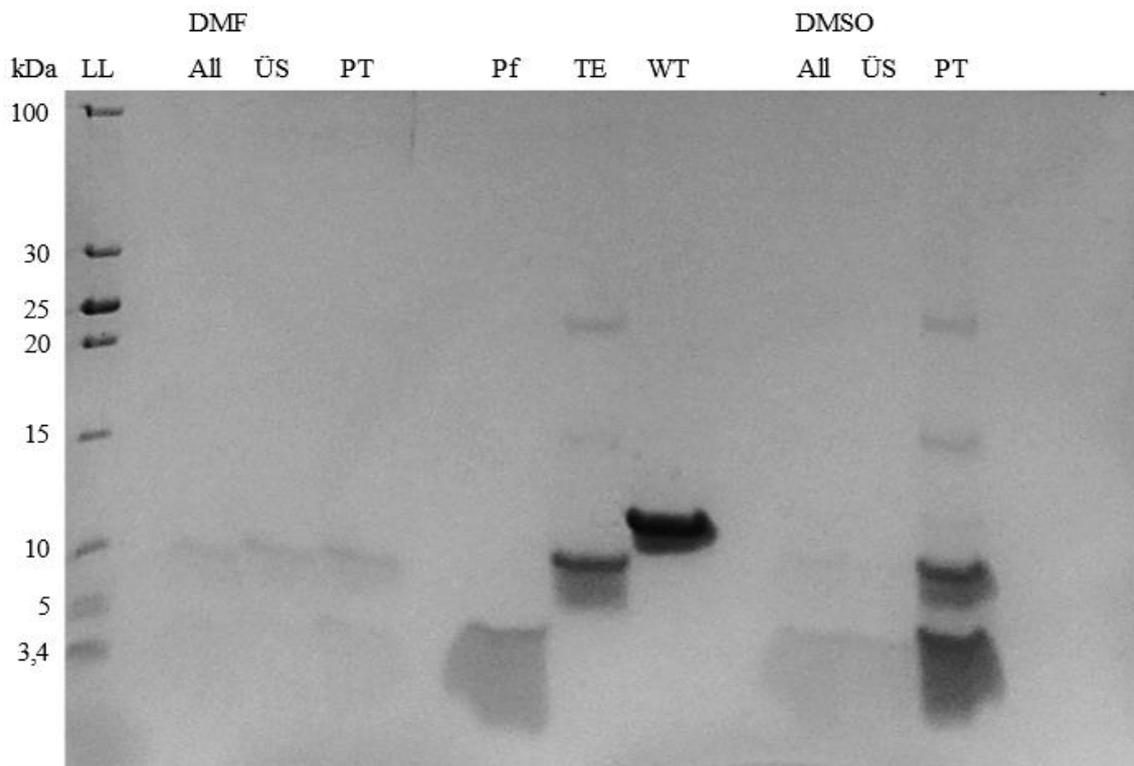


Abbildung 6 SDS-Gel der Ligation des Par10 mit NCL-Puffer.

Das Elektropherogramm (Tris/Tricine SDS-Page, gefärbt mit Coomassie) zeigt die Ligation der Par10-Fragmente mittels verschiedener organischer Lösungsmittel an. Low Ladder (LL): Page Ruler™ – Unstained Low Range Protein Ladder (Anhang 5). All – Ansatz; ÜS – Überstand; DL - Pellet

In Tabelle H werden die Ligationen miteinander verglichen und subjektiv bewertet.

Tabelle H: Vergleiche und Bewertung der Ligationsoptimierungen

dargestellt sind auszugsweise untersuchte NCLs, sowie verschiedene Optimierungsversuche. Diese wurden nach ihrem subjektiven Erfolg bewertet. Weitere NCLs sind in Anhang 1 zu finden.

Optimierung	Untersuchte Bedingungen	Bewertung	Verweis
Verhältnis Peptid In NCL-Puffer	Ester- • 1:1	++	Abb. 4
	• 1:2	+++	
	• 1:3	++++	
	• 1:5	+	
	• 1:1	++	
	• 2:1	+++	
	• 3:1	++++	
	• 5:1	+	

Verschiedene Peptidzusätze und Thiole	• DMF und Thiophenol • Ester-Peptid Verhältnis → 1:3 → 3:1	+	-	Abb. 5					
					• DMF und MPAA • Ester-Peptid Verhältnis → 1:3 → 3:1	+	-		
	• TFE und Thiophenol • Ester-Peptid Verhältnis → 1:3 → 3:1	++	-						
					• TFE und MPAA • Ester-Peptid Verhältnis → 1:3 → 3:1	+	-		
	Ligation mit chaotropen Salzen	• NCL-Puffer • Ester-Peptid Verhältnis → 1:1 → 2:1 → 3:1	-					-	Anhang B6
					• Guanidin (6 M) • Ester-Peptid Verhältnis → 1:1 → 2:1 → 3:1	-	-		
		• Ester-Peptid (H ₂ O) Verhältnis → 1:3 in NCL- Puffer Zusatz: 100 µl DMF	-					+	
• Ester-Peptid (H ₂ O) Verhältnis → 1:3 in NCL- Puffer Zusatz: 150 µl DMSO				-	++				
		NCL mit organischen Lösungsmitteln	• Ester-Peptid (H ₂ O) Verhältnis → 1:3 in NCL- Puffer Zusatz: 100 µl DMF			-	+	Abb. 6	
• Ester-Peptid (H ₂ O) Verhältnis → 1:3 in NCL- Puffer Zusatz: 150 µl DMSO				-	++				

Die Ausbeute an Parvulin-Derivat konnte durch mehrere Optimierungsprozesse etwas gesteigert werden. Der Umsatz der Ligation war jedoch nicht quantitativ, da sich stets Anteile der Edukte im Ansatz befanden. Um das Parvulin auf Aktivität untersuchen zu können müssen die Edukte aus den Ansätzen entfernt werden.

Für die Untersuchung der Aktivität von Parvulin wurden verschiedene Ansatzstrategien getestet. Beim besten Ansatz wurde ein Peptid-Thioester-Verhältnis von 1:3 verwendet. Die Umesterung sollte bei pH 7,5 mittels Thiophenol erfolgen. Für eine Ansatzgröße eignen sich 100 µl zuzüglich DMSO als Lösungsmittel. Mit einem Ansatz dieser Parameter wurde die größte Ausbeute erreicht und verschiedene Reinigungsstrategien getestet.

5.4 Reinigungsstrategien

Um vom synthetisierten Parvulin-Derivat die Aktivität zu bestimmen, wurden verschiedene Reinigungsschritte ausgeführt. Diese sollten zum einen die Edukte von dem Produkt trennen, zum anderen das Parvulin in eine stabilere Umgebung bringen. Dabei wurden die verschiedenen physikochemischen Eigenschaften der Reaktanten ausgenutzt. So konnte eine Trennung nach molekularem Volumen bzw. Radius erfolgen. Beide Edukte sind deutlich kleiner als das Produkt und eine Separation nach dem Molekulargewicht ist möglich. Diese Trennung erfolgte durch eine Amicon^R-Filtereinheit und Zentrifugation. Eine zweite Möglichkeit ist, die unterschiedlichen ionischen Wechselwirkungen des Peptides ($pI = 8,19$) und des Parvulins ($pI = 9,28$) bzw. des Thioesters ($pI = 9,26$) zu nutzen. Hierbei wurden Kationenaustauscher verwendet, um das Peptid abzutrennen. Außerdem besitzen die Ligationsreaktanten unterschiedliche Hydrophobizitäten. Dies wurde für eine Trennung mittels RP-HPLC ausgenutzt. Dabei wurden verschiedene Säulen getestet. Diese unterscheiden sich in ihren hydrophoben Eigenschaften.

5.4.1 Molekulargewicht / Molekularvolumen

Um die Edukte zu entfernen, wurde der NCL-Ansatz mittels einer Amicon^R-Filtereinheit (MWCO: 10.000 MW) zentrifugiert. Der Erfolg dieser Methode wurde anschließend per SDS-Page überprüft (Anhang B7). In Probe „Konz“ sieht man sowohl Produkt (11001 Da) als auch beide Edukte (7347 Da; 2897 Da).

5.4.2 Polare Wechselwirkungen

Die Trennung über ionische Wechselwirkungen erfolgt aufgrund verschiedener pI -Werte der einzelnen Komponenten der NCL. Es wurde mit einem starken polymeren Kationenaustauscher gearbeitet. Das Ergebnis der Trennung wurde per SDS-Page (Abb. 7) visualisiert. In allen Probenfraktionen (P1-4) befinden sich sowohl Peptidfragment als auch Thioester. Das Peptid wurde auch im Waschschrift (W) heruntergelöst. Bereits bei einer Salzkonzentration von 50 mM (50) wurde das Produkt eluiert. In den nachfolgenden Fraktionen (100 – 500) wurde kein Peptid mit heruntergespült.

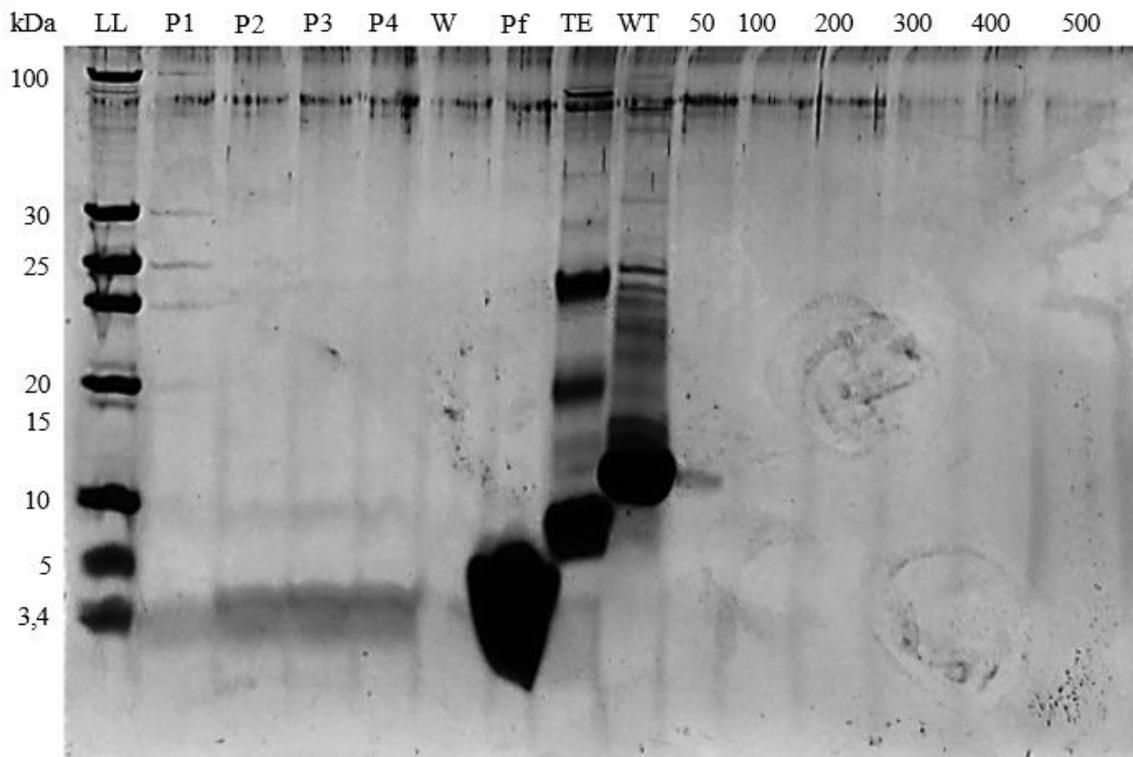


Abbildung 7 SDS-Gel NCL nach Kationenaustauscher.

Das Elektropherogramm (Tris/Tricine SDS-Page; Silberfärbung) die Fraktionen der NCL nach einem Kationenaustauscher (LL): Page Ruler™ – Unstained Low Range Protein Ladder; P – Probe; W – Waschschrift; 50 – 500 – Konzentration von NaCl in mM

5.4.3 Hydrophobizitäten

Die Trennung der Ansätze erfolgte aufgrund der Hydrophobizität der Reaktanten. Peptide, welche hydrophober sind, werden länger zurückgehalten. Dabei ist der pH-Wert aufgrund des Laufmittelsystems (0,1% TFA) sehr sauer.

C18-Säule

Der Erfolg der Trennung mittels C18-Säule wurde per SDS-Page und Chromatogramm (Anhang B8) dokumentiert. Dabei wurden zwei verschiedene NCL-Ansätze verwendet, um möglicherweise Vergleichswerte der NCLs zu erhalten. Im TFE enthaltenen Ansatz sind weder Edukte noch Produkt auf dem Gel sichtbar. Bei der Ligation in NCL-Puffer konnten Edukte und Produkt aufgefangen werden. Dabei ist ersichtlich, dass zwischen 49 und 55 % ACN sowohl Peptid und Thioester als auch Parvulin von der Säule gelöst werden. In Probe N49 erscheinen alle Edukte in einem Peak.

C8-Säule

Mithilfe einer SDS-Page und Chromatogramm wurde die Trennung mittels C8-Säule ausgewertet (Abb. 8) (Anhang B8). Dabei ist zu sehen, dass die Trennung des Thioesters von den anderen Reaktanten gelang. In den Proben 41,6 bis 43,0 ist reiner Thioester ohne Parvulin

zu erkennen. Die Banden 43,6 bis 47,6 zeigen Parvulin sowie ein Teil des Peptides. Das Peptid erstreckt sich durch alle aufgefangenen Peaks, die im Zusammenhang mit der Ligation stehen. Kleinste Mengen des Thioesters können in Bande 43,6 detektiert werden, jedoch ist die zugehörige Bande in Probe 47,6 verschwunden.

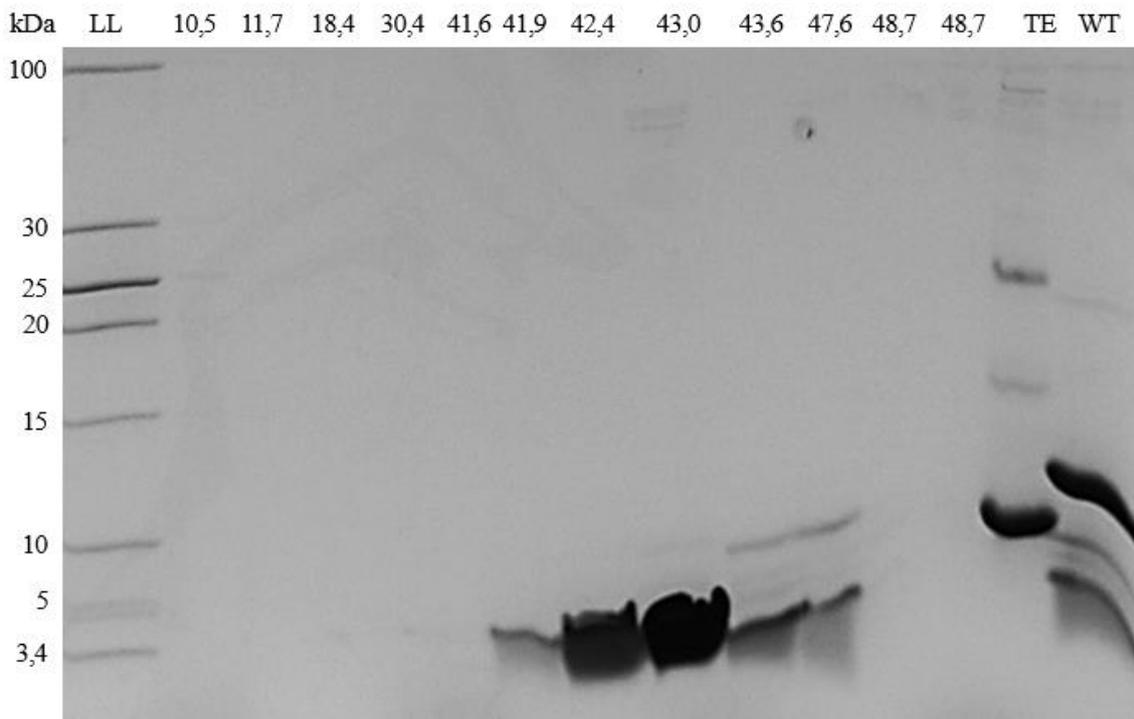


Abbildung 8 SDS-Gel NCL nach hydrophober Trennung per HPLC (C8).

Das Elektropherogramm (Tris/Tricine SDS-Page gefärbt mit Coomassie) zeigt aufgefangene Peaks nach der HPLC-Trennung (LL): Page Ruler™ – Unstained Low Range Protein Ladder; TE – Thioester; WT – Parvulin 10 (Wildtyp) [Zahl] – % ACN bei welchem der Peak erschien.

Die Reinigungsstrategien werden in Tabelle I miteinander verglichen und hinsichtlich ihrer Effektivität miteinander verglichen.

Tabelle I: Vergleiche der Reinigungsstrategien

Reinigungsstrategie		Erfolg	Verweis
Molekularvolumen/ Molekulargewicht	Amicon ^R		Anhang B7
	MWCO → 3000	-	
	→ 5000	-	
Polare Wechselwirkungen	→ 10.000	-	Abb. 7
	Strata X-CS starker Polymerer	+	
	Kationenaustauscher		
Hydrophobizität	SP Sepharose HP Kunstharz	-	Anhang B8
	Kationenaustauscher		
	Nucleodur 100-5 C18ec	-	
	Reverse Phase C8	++	Abb. 8

Dargestellt sind die getesteten Reinigungsstrategien sowie deren Erfolg im Vergleich.

Ligations-Upscaling

Die Ausbeute des Parvulin-Derivates ließ sich mit mehreren Optimierungsprozessen etwas steigern. Da die Aktivität des Parvulins untersucht werden sollte, gab es zwei Ansätze, die verwendet werden konnten, um eine ausreichende Menge an Parvulin zu erhalten. Einerseits wurde versucht, die Edukte durch verschiedene Verfahren aus dem Ansatz zu entfernen, um reines Parvulin zu generieren. Dieser Erfolg der Reinigungsstrategien ließ sich nur bedingt feststellen, da in der NCL durch die geringe und schwer einzuschätzende Thioesterkonzentration, kein quantitativer Umsatz stattfand. Der zweite Gedanke, die Ansatzgröße zu vergrößern resultierte weiterhin in einer unzureichenden Parvulinkonzentration.

5.5 Bestimmung der Aktivität

Von dem mittels Kationenaustauscher gereinigten Parvulin-Derivat aus (Abb. 6) wurde die Aktivität der generierten Variante bestimmt. Die Messung der Parvulin-Aktivität erfolgt über einen Protease-gekoppelten PPIase-Assay nach FISCHER. Durch eine Variation der Konzentrationen an Parvulin zwischen 1 und 6 nM konnte eine Abhängigkeit mit der Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt werden. Darüber hinaus ließ sich ein k_{cat}/k_m von 4,70 für das Parvulin-Derivat bestimmen (Tab. J). Diese Messungen wurden sowohl für Wildtyp-Parvulin 10, als auch für die generierte Variante Parvulin 10 – Pf, durchgeführt und anschließend mit den Literaturwert verglichen. Die Werte befinden sich in der gleichen Größenordnung. Der Vergleich mit dem Parvulin-Derivat zeigt mit einem Verhältnis von 1/0,53 eine stark verminderte Aktivität an.

Tabelle J: Parvulinaktivitäten im Vergleich.

Die einzelnen K_{cat}/K_m -Werte der Parvuline im Vergleich mit dem Literaturwert. Zusätzlich sind die umgesetzten Substrate aufgelistet.

	Substrate	$K_{cat}/K_m \times 10^6$ [M/s]
Fischer ¹	Glt-Ala-Ala-Pro-Phe-NHNp	14,60
Parvulin 10 Wildtyp	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	8,95
Parvulin 10 - Pf	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	4,70

¹[Fischer, 1984]

Der cis-Anteil an Substrat (Glt-Ala-Ala-Pro-Phe-NHNp) liegt laut FISCHER bei $10,0 \pm 1,5$ % [Fischer, 1985]. Bei Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA liegt der ermittelte cis-Anteil bei $17,53 \pm 3,3$ %.

6 Diskussion

In Kapitel 5 wurden die Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt. Im folgenden Kapitel sollen die Erfolge aufgezeigt, kritisch hinterfragt und auf Herausforderungen hingewiesen, sowie an geeigneter Stelle Lösungsvorschläge und Perspektiven für folgende Arbeiten dargestellt werden.

6.1 Synthese Par10 (1-67) als Thioester

Die Synthese des Thioesters wurde erfolgreich Intein-vermittelt durchgeführt und konnte sowohl in SDS-Pages als auch massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Abb. 1; 3). Die Expression in *E. coli*, der Zellaufschluss und die Thioestergenerierung mittels Proteinspleißen waren erfolgreich. Die Reinigung des Par10-Fragmentes wurde mittels SDS-Page mit Proben von verschiedenen Reinigungsschritten der Affinitätschromatographie, sowie der Expression und des Zellaufschlusses ausgewertet (siehe 5.1.1). In den beiden Migrationsbanden „o.IPTG“ und „n.Z.“ werden Proben gezeigt, welche kurz nach der Induzierung mit IPTG, beziehungsweise nach Zellaufschluss der *E. coli*-Kultur (Stamm: ER2566), entnommen wurden. Die Probe „n.Z.“ enthält das Par10-Fragment (1-67) mit Intein (32 kDa). Größere Proteinstrukturen stammen vermutlich aus *E. coli*-Zellen. Die Proben „E5“ und „E6“ weisen eine erhöhte Konzentration des Parvulinfragmentes (1-67) auf (Abb. 1). Die Elutionsproben (E4-E6) wurden über einen Zeitraum von 12 Stunden genommen. Mit fortschreitender Zeit wird der Erfolg des Proteinspleißens sichtbar, die Bildung und Elution des Thioesters von den Chitinbeads nimmt zu. Bei der erneuten Elution mit B4-Puffer nach Tab. D war der Thioester enthalten (Abb. 1; Anhang B5, B6). Die Migrationsbande „Beads“ zeigt eine Bande bei 25 kDa, was der Größe des Inteins mit der Chitinbindedomäne entspricht. Es zeigt den Erfolg des Thiol-induzierten Proteinspleißens, da der Intein-Komplex mit Par10-Fragment eine Größe von 32 kDa besitzt. Die Differenz von 7 kDa wäre auf der SDS-Page erkennbar. Die Abwesenheit der Bande bei 32 kDa zeigt, dass die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie sehr gut funktionierte. E6 weist eine hohe Konzentration an Thioester auf (Abb. 1). Innerhalb der Inkubationszeit konnte das Proteinspleißen abgeschlossen werden und ein Maximum an Thioester erhalten werden (Tab. D). In wässrigen Lösungen kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Thioester hydrolysiert und freie Säure gebildet wird. Aufgrund des ähnlichen Molekulargewichtes der freien Säure ($7222 [M + H]^+$) ist es nicht möglich, zwischen dem Thioester und der freien Säure in dem Gel der SDS-Page zu unterscheiden (Abb. 1). Daher wurde versucht, mit Hilfe der Massenspektrometrie (Abb. 3), das Verhältnis beider Massen zueinander zu bestimmen. Es konnte ein Verhältnis

von 1:0,57 ermittelt werden. Da die freie Säure nicht vom Thioester getrennt werden kann, wird in folgenden Erwähnungen nur von Thioester gesprochen. Nach Auswertung der SDS-Page (Anhang B5), beträgt die Konzentration des Thioesters in der Stammlösung circa 2 μ M.

6.2 Synthese und Aufreinigung der Par10-Fragmente (68-92)

Die von Dr. rer. nat. Lars Franke mittels SPPS synthetisierten Par10-Fragmente lagen als Rohprodukte vor und mussten gereinigt werden. Diese Aufreinigung konnte erfolgreich durchgeführt werden (siehe 5.1.2). Hierfür wurden etablierte Reinigungsverfahren der AG Bordusa verwendet (siehe 4.1.2; 4.1.3). Die an den gereinigten Peptiden durchgeführten UPLC-MS-Analysen zeigten jeweils Einzelpeaks mit den erwarteten Molekulargewichten (± 1) (siehe 5.1.2; Anhang B1). Pf und Py zeigen gut erkennbare Einzelpeaks in den Chromatogrammen (Anhang B2). Nach der HPLC-Reinigung ist bei Peptid Pv ein Doppelpeak zu sehen. Die Nähe der beiden Peaks lässt darauf vermuten, dass es sich um Analoge des Peptides Pv handelt (Anhang B2). In den Massenspektren aller Peptide nach der Reinigung sind zusätzliche, unspezifische Massen zu erkennen. Da diese im selben Signal wie die Peptidmassen liegen, können sie dem Peptid zugeordnet werden. Vermutlich handelt es sich hierbei um Fragmentierungen, die bei der Ionisierung im Massenspektrometer entstehen.

6.3 Initiale Hydrolysestudie

Die Vergleichswerte für die Auswertung des enzymatischen Peptidverdaus stammen aus der Vorarbeit von Lennart Hartig mit *D*-Phe, *D*-Tyr, *D*-Val und den *D*-stereospezifischen Hydrolasen [Hartig, 2018]. Seine Arbeit bezog sich auf initiale Versuche zur Bestimmung der Selektivität der *D*-Aminosäurespezifischen Hydrolasen und wurde vereinfacht an einem Modellpeptidsystem durchgeführt. Das Modellsystem wurde hier durch ein Alanin-Screening-Systems innerhalb einer Peptidbibliothek vom Typ Abz-AAxFAA-K(DNP)-OH dargestellt. Im Gegensatz dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit längere Peptide (25 AS) verwendet, die eine breitere Auswahl an Aminosäuren enthalten. Ein so langes Modellpeptid bedingt allein aufgrund seiner Größe eine Struktur, welches es Enzymen erschweren könnte, Zugang zur *D*-Aminosäure zu erhalten. Doch auch die sekundären Wechselwirkungen der Aminosäure-Seitenketten verändern den Zugang und die Wirkung der Enzyme auf das Peptid. Somit unterscheiden sich beide Substratmodelle stark in ihrer Art und Komplexität. Vergleiche mit HARTIG lassen sich nur bedingt anstellen. Dennoch geben die Vorarbeiten von HARTIG ein Indiz auf die prinzipielle Hydrolyse der Peptide durch die verwendeten Enzyme. Analoges gilt für die Forschung von MÜLLER, welcher die

Substratspezifitäten von *PBP5* ermittelte [Müller, 2021]. Dieses Enzym hydrolysiert die Umsetzung von *D*-Alanin, und kann so als Negativkontrolle für die Hydrolysestudie dieser Arbeit verwendet werden. Die unterschiedliche Länge der Substrate (Hartig: 7 Aminosäuren; eigene Arbeit: 25 Aminosäuren) kann zu einer unterschiedlichen Akzeptanz gegenüber den Hydrolasen führen. So kann beispielsweise eine Längenlimitation auftreten. Dies bedeutet, dass durch die Struktur oder Länge der Aminosäurekette, diese nicht in die Bindetasche der Hydrolasen einfügen lässt. Somit wäre prinzipiell eine Hydrolyse möglich, aber die Substratakzeptanz reicht nicht aus, um dies zu überprüfen. Dies würde die Enzyme für den diagnostischen Einsatz ungeeignet machen. Die *DHy1* ist vermutlich längenlimitiert. Drei zusätzliche Aminosäuren *N*-terminal der *D*-Aminosäure sind das Maximum für einen erkennbaren Umsatz der Substrate. *C*-terminal hingegen ist kein Limit der Aminosäureanzahl erkennbar. Alle weiteren *DHys* haben bis zu vier Aminosäuren *N*- und *C*-terminal der Spaltstelle keine nachweisbare Beschränkung hinsichtlich der Länge des Peptids [persönliche Korrespondenz mit Dr. Andreas Simon].

6.3.1 Hydrolysestudie Peptid Pf (F83f)

Die erhaltenen Daten aus der Hydrolysestudie mit dem Peptid Pf können eine Hydrolyse durch die *DHys1*, 3 und 4 nachweisen. Es lässt sich eine Abnahme der Eduktkonzentration durch verschobene Peaks und Spaltprodukte im Chromatogramm und den zugehörigen Massenspektren (Tab. G; Anhang B3) nachweisen. Dies entspricht den Erwartungswerten auf Basis der Vorarbeiten von HARTIG [Hartig, 2018]. HARTIG zeigt, dass aromatische *D*-Aminosäuren wie Phenylalanin durch *D*-Hydrolasen umgesetzt werden. Ausnahme davon ist *DHy1*, welche laut HARTIG den schlechtesten Umsatz im Vergleich aller *DHys* besitzt. Es ist unklar, ob dies auf eine Längenbeschränkung des Peptids zurückzuführen ist. *DHy1* besitzt gegenüber Peptid Pf jedoch eine unerwartete gute Substratspezifität. Eine Strukturbildung des Peptides könnte die Limitation umgangen haben. Die Negativkontrolle mittels *Pbp5* zeigt keinen Umsatz. Diese soll nur *D*-Alanin umsetzen können [Müller, 2021]. Interessanterweise ist *DHy2*, welche nach HARTIG einen relativ schnellen Umsatz von *D*-Phenylalanin haben sollte, nicht in der Lage, das Peptid Pf zu hydrolysieren [Hartig, 2018]. In Vorversuchen konnte ein Präzipitieren der Edukte beobachtet werden. Dies deutet auf eine räumlich strukturelle Änderung des Peptides durch den Einbau von *D*-Phenylalanin hin. Die Substitution der *L*- zur *D*-Aminosäure könnte das Phenylalanin für das Enzym unzugänglich gemacht haben. Eine eventuelle Strukturänderung könnte durch CD-Spektren oder optische Rotationsdispersion (ORD) nachgewiesen werden. Weitere Ursachen für die verhinderte

Hydrolyse kann eine Größen- bzw. Längenabhängigkeit des Enzymes sein, die bisher noch nicht nachgewiesen wurde. Dies würde bedeuten, das Enzym *DHy2* wäre für einen möglichen diagnostischen Einsatz ungeeignet. Das Peptid ist das bisher größte Substrat (25 AS), mit welchem die *DHys* getestet wurden. Es ist also möglich, dass das Peptid zu viele Aminosäuren besitzt, um in das aktive Zentrum des Enzymes zu binden. Die Akzeptanz als Substrat wäre damit, trotz des *D*-Phenylalanins, nicht gegeben.

Alle Ansätze zur Hydrolyse des Peptids Pf sind aufgrund von Herausforderungen mit der Löslichkeit des Peptids kritisch zu betrachten, da die Konzentration des gelösten Peptides abweichen kann. (Tab. G; Anhang B3).

6.3.2 Hydrolysestudie Peptid Py

Das Peptid Py wurde erfolgreich durch *DHy2*, 3 und 4 hydrolysiert (Tab G). Nach Zugabe der Enzyme ist in den Chromatogrammen eine Abnahme der Peaks der Edukte und eine Zunahme der Spaltprodukte zu erkennen, was durch die korrekten Massen bestätigt wurde (Anhang B3). Dies deckt sich mit früheren Untersuchungen von HARTIG [Hartig, 2018], der durchgehend gute Umsätze von aromatischen Aminosäuren wie *D*-Tyrosin durch die *DHys* 2-4 fand. *DHy1* zeigt den schlechtesten *D*-Tyrosin-Umsatz mit $< 10^{-3}$ kat/mol [Hartig, 2018]. Das stimmt mit den Ergebnissen, dass Peptid Py durch *DHy1* nicht hydrolysiert wurde, überein (Tab. G). Py konnte nicht als Substrat erkannt werden. Dies könnte, wie schon bei Peptid Pf, an einer strukturellen Änderung des Peptides liegen (siehe. 6.3.1). Jedoch ist auch das Gegenteil möglich. Wenn das Peptid linear vorliegt, dann könnte dieses für das aktive Zentrum der *DHy* zu groß sein und es wird nicht als Substrat akzeptiert. Der Umsatz durch *DHy1* ist langsamer als andere *DHys* [Simon, 2021]. Daher ist auch denkbar, dass der Umsatz an Peptid Py innerhalb von 120 Minuten zu gering war, um detektiert zu werden. Die Negativkontrolle mit *Pbp5* zeigt wie erwartet keinen Umsatz.

6.3.3 Hydrolysestudie des Peptides Pv

Sowohl *DHy1* als auch *DHy4* hydrolysieren Peptid Pv (Tab. G). Nach dem Enzymverdau sind Spaltprodukte im Massenspektrum auffindbar (Anhang B3). Der Umsatz des Peptides ist jedoch nicht quantitativ. Dies stimmt mit der Literatur [Hartig, 2018] überein. In der Arbeit von HARTIG ist der Umsatz von *D*-Valin durch die *DHys* sehr langsam. Dies ist konsistent mit den Erkenntnissen, dass *DHys* aromatische Aminosäuren stark bevorzugen. Daher wird *D*-Valin deutlich schlechter umgesetzt als *D*-Phe und *D*-Tyr. Dies deckt sich grundlegend mit Vergleichen der anderen Peptide. Der Umsatz durch *DHy1* widerlegt erneut die vermutete Längenlimitation dieses Enzymes. *DHy2* und 3 hydrolysieren das Peptid Pv nicht. Gründe

hierfür sind wahrscheinlich die Bildung einer Struktur und der damit verhinderte Zugang der Enzyme zu *D*-Valin. Laut den Ergebnissen von HARTIG sollten die Enzyme in der Lage sein, das Peptid umsetzen [Hartig, 2018]. *DHy2* zeigte in der Arbeit von HARTIG gute Aktivitäten sowohl gegenüber *D*-Valin als auch *D*-Leucin. Aufgrund der ähnlichen Struktur beider Aminosäuren müsste die Spaltung der Peptidbindung nach *D*-Valin funktionieren. Dies kann anhand der Ergebnisse der Arbeit nicht bestätigt werden. Da die *DHy2* auch nicht in der Lage ist, das Peptid Pf umzusetzen, wäre auch hier eine Art Längenlimitation denkbar (siehe 6.3.1). *DHy3* bevorzugt aromatische Seitenketten, dies könnte die fehlende Hydrolyse des Peptids mit *D*-Valin erklären. Die Möglichkeiten für fehlende Hydrolaseaktivitäten werden in 6.3.1 und 6.3.2 näher erläutert. *PbP5* als Negativkontrolle zeigt erwartungsgemäß keine Umsätze. [Müller, 2021].

6.4. Natürlich Chemische Ligation (NCL)

Die erfolgreich generierten Par10-Fragmente aus Abschnitt 5.1 sollten im Folgenden zu vollständigen Parvulin-Derivaten ligiert werden. Dies geschah nach dem Prinzip einer natürlich chemischen Ligation (NCL) (siehe 1.6). Die Ligation wurde nach Dawson [Dawson et al; 1994] verändert und angewendet. Bei dem Gehalt des Thioesters handelt es sich um den limitierenden Faktor für die Ausbeute der NCL. Die ermittelte Konzentration des Thioesters in der Stocklösung beträgt 2 μM (siehe 5.3.1) und definiert dadurch die theoretisch maximal erreichbare Ausbeute an Parvulin-Derivat nach der NCL. Für die Ligation wurde 600 nM des Thioesters verwendet. Bei einem Vollumsatz des Thioesters, würde die Masse an Parvulin 8,8 ng entsprechen, Dies liegt an der unteren Nachweisgrenze für die Färbung von SDS-Gelen mittels Coomassie-Blaus. Zum Vergleich, Coomassie besitzt eine Nachweisgrenze von 8-10 ng [Neuhoff et al, 1985]. Selbst eine Silberfärbung nach NESTERENKO braucht für einen Nachweis mindestens 3-5 ng [Nesterenko et al, 1994]. Der Nachweis des Produktes war aufgrund der geringen Konzentration auf der SDS-Page also nur schwer feststellbar. Mit fortschreitender Zeit wird der Thioester weiter zur freien Säure hydrolysiert und die zuvor ermittelte Konzentration nimmt ab und erreicht weniger als 2 μM . Je länger der Thioester genutzt wird, desto geringer wird auch die Konzentration dessen. Dies verschiebt dadurch auch das theoretisch erreichbare Maximum für das durch die NCL entstehende Parvulin-Derivat. Eine genaue Aussage, welche Ausbeute die NCL hatte, lässt sich dadurch nicht treffen. Ein kritischer Punkt für alle NCLs ist der pH-Wert. Je höher dieser ist, desto besser ist dies für die Umesterung des Thioesters (1-67) mit Thiophenol. Dieses estert idealerweise bei einem pH-Wert von etwa 9-10. Im basischen Bereich beginnt der

Thioester jedoch zu hydrolysieren. Ein pH-Wert von 7-8 ist der geeignete Kompromiss für die Ligation. Die Umesterung verläuft langsamer, jedoch wird auch der Thioester entsprechend langsamer hydrolysiert. Während der Reaktionszeit konnte eine teilweise Veränderung des pH-Wertes festgestellt werden. Die genauen Gründe dafür sind nicht ermittelbar. Jedoch ist denkbar, dass sich Parvulin bildete und dieses dann präzipitierte. Dadurch entsteht ein Ungleichgewicht von Peptid und freier Säure welches zu einem Ansäuern des Ansatzes und somit der Änderung des pH-Wertes führt. Auch die Löslichkeit der Reaktanten ist für die Ligation der Fragmente zu Parvulin-Derivat essenziell. Es konnte beobachtet werden, dass die Löslichkeit im Laufe der Zeit angepasst werden musste. Durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln wie DMF oder DMSO lässt sich dies zeitweise unterbinden. Eine bessere Löslichkeit durch eine erhöhte Zugabe von Reduktionsmittel (TCEP) führt zu verstärkter Reduzierung des Cysteins. Jedoch resultiert das in einem starken Rückgang der Ligationausbeute. Für zukünftige Ligationen sollte eine Kombination aus organischen Lösungsmitteln und dem Zusatz von Reduktionsmitteln sicherstellen, dass alle Reaktanten der Ligation in Lösung bleiben.

6.4.1 Ligation mit NCL-Puffer und verschiedenen Peptidkonzentrationen

Bei diesen Ansätzen wurde die Umesterung mit Thiophenol durchgeführt. Die Thiolgruppe stabilisiert die Carboxykomponente und stellt eine günstige Abgangsgruppe dar, die aufgrund ihrer geringen Löslichkeit in Wasser dem Reaktionsgleichgewicht entzogen wird. Der Nachteil von Thiophenol ist, dass der Thioester durch die verringerte Löslichkeit ausfallen kann und somit der Reaktion als Edukt entzogen wird. Bei den Präparationen wurde NCL Puffer verwendet, der den pH-Wert stabilisieren und eine Ausfällung des Peptids oder Thioesters verhindern soll. Die Auswertung per SDS-Page zeigt, für jeden Thioester enthaltenen Ansatz eine Bande bei circa 25 kDa (Abb. 4). Diese ist auch bei Elutionsschritt 6 zu sehen (Abb 1). Wahrscheinlich ist dies Intein mit Chitinbindedomäne, welches mit von der Säule eluiert wurde. In ähnlicher Weise sind die Banden bei 14-15 kDa auf Thioester zurückzuführen. Diese Banden wurden durch Dimerisierung des Thioesters aufgrund seiner Cysteine gebildet. Das steht im Einklang, dass mit zunehmender Thioesterkonzentration die Bandenstärke bei 14-15 kDa zunimmt. Mit der Peptidkonzentration nimmt auch die Konzentration des Thioesterdimers im Ligationansatz zu (Abb. 4). Dies ist wahrscheinlich auf oxidierte Peptide zurückzuführen. Diese sind nach der HPLC durch das TFA im Laufmittel protoniert. Im Ligationansatz sind die Cysteine durch die pH-Änderung reaktiv und neigen somit zur Oxidation. Dies begünstigt die Ausbildung von Dimeren. Die

Peptiddimere (5792 Da) werden jedoch durch die Thioestermonomere auf der SDS-Seite verdeckt. Eine weitere Erklärung für die Sichtbarkeit von Thioesterdimeren ist, dass diese aufgrund ihrer Länge (2x 67 AS) und der damit verbundenen Struktur schlechter mit β -Mercaptoethanol (3x Probenpuffer) zu reduzieren sind. Daher können Thioester nicht vollständig reduziert werden. Im Gegensatz dazu sind Peptiddimere (2x 25 AS) kürzer und somit besser reduzierbar. Die höchste Konzentration an Parvulin10 befindet sich in den Proben „TE3“ und „P3“ (Abb. 4). Diese beide Ligationen funktionieren augenscheinlich am besten. Dort sind jeweils Thioester oder Peptid im Überschuss vorhanden. Die NCL ist eine Reaktion 2. Ordnung. Ein Überschuss an Peptiden oder Thioester verschiebt das Gleichgewicht der Reaktionen in Richtung des Zwischenproduktes. Infolgedessen bildet sich mehr Parvulin, wie an der Stärke der eingefärbten Bande zu erkennen ist. Die scheinbar konstante Konzentration des Thioesters (TE1-5) ist ein Trugschluss aufgrund der Färbung des Gels. Der Thioester ist mit 67 AS deutlich größer als das Peptid (25 AS). Die Färbung des Gels erfolgt über das Peptidrückrad mit Coomassie-Blau. Durch die geringere Größe des Peptides erzeugt das Peptid über Coomassie eine geringere Färbung im Gel. Somit ist die Nachweisgrenze bei Konzentrationsänderungen geringer, als die des Thioesters. Die Reaktion 2. Ordnung erklärt auch die geringere Konzentration an Produkt in den Proben „P1“; „P2“; „TE1“; „TE2“, da in diesen Proben der Überschuss von Thioester oder Peptid ungünstig für die Reaktion ist. In den Proben „P5“ und „TE5“ wird kaum beziehungsweise kein Produkt gebildet (Abb. 4). Es wurde hier die Löslichkeitsgrenze der Edukte überschritten, sodass die Ligation nicht unter optimalen Bedingungen ablaufen konnte. Es kam während der Präparation der Ligation zum Präzipitieren von Substanzen. Zuzuordnen ist das sowohl dem Thiophenol, welches für eine geringere Löslichkeit der Thioester sorgte, als auch den gereinigten Peptiden, welche den Ansatz oxidierten. Bei diesen Präzipitaten handelt es sich vermutlich um gefaltete Peptide und Thioester, welche der NCL entzogen wurden. Somit wurde diese ineffektiv. Folglich sollte die Ligation durch die Erhöhung reduzierender Zusätze verbessert werden.

6.4.2 Ligation mit verschiedenen Peptidzusätzen und Thiolen

Nach der Bestimmung des Peptid-Thioesterverhältnisses, wurde die Kombination an verschiedenen Peptidzusätzen und Thiolen getestet. Damit sollte einerseits das Löslichkeitsproblem verbessert werden, als auch die Ausbeute der NCL. Hierfür wurden zwei verschiedene Zusätze (DMF, TFE) mit jeweils zwei verschiedenen Thiolen (Thiophenol, MPAA) genutzt. Über alle Ansätze hinweg wurde bei der Ligation das Peptid nicht

vollständig verbraucht (Abb. 5). Der Thioester ist in „D1M“; „F1M“ und „F3M“ zu finden. Dies stimmt mit der augenscheinlich fehlgeschlagenen Ligation dieser Banden überein. Die einzige Produktbande in diesem Gel ist „F1T“. Hier findet sich eine sichtbar schwache Produktbande. Da sich dieser Ansatz nur im Thiol MPAA von „F1M“ unterscheidet, bedeutet dies, dass Thiophenol als Thiol für die NCL besser geeignet ist. Jedoch befindet sich „F1T“ direkt neben der Referenz-Parvulin10-Bande. Das Produkt könnte durch Präparationsfehler entstanden sein. Peptidzusätze wie DMF und TFE scheinen keinen Einfluss auf den Erfolg der Ligation zu haben. Sie erhöhen die Löslichkeit der Ansätze jedoch erst nach der Ligation. In allen Ansätzen mit MPAA ist noch Thioester aufzufinden. Diese Ligationen haben während der NCL weniger Thioester verbraucht. Zwar ist in Ansätzen mit Thiophenol ebenso kein Produkt ersichtlich, jedoch ist der Thioester nicht mehr als Bande zu sehen. Das Aufbrauchen an Thioester in Thiophenol-Ansätzen zeigt die höhere NCL-Aktivität dieser. Da die theoretische maximale Ausbeute nur 600 nM beträgt (siehe 6.4), ist es möglich, dass in jedem Ansatz Parvulin-Derivat entstanden ist. Dieses wurde jedoch nicht durch die Färbung mit Coomassie-Blau nachgewiesen. Eine Silberfärbung des Gels würde aufgrund seiner geringeren Nachweisgrenze Gewissheit bringen. Aufgrund einer vorangestellten Trocknung des Gels war dies nicht mehr möglich.

6.4.3 Ligation mit chaotropen Salzen

Bei dieser Ligation wurden als Zusätze chaotrope Salze verwendet um die Löslichkeit der Ansätze während der Ligation zu fördern. Die Umesterung erfolgte durch Thiophenol und die Auswertung durch SDS-Page (Anhang B6). In keinem der Reaktionsansätze wurde Parvulin-Derivat nachgewiesen. Durch die Präparation ist in Probe „P“ Parvulin10 zu sehen. Die Analyse zeigte auch, dass es sich bei den Banden bei 10, 20 und 30 kDa (Anhang B6) in der Probe "WT" um Di- und Trimere von Parvulin 10 handelt, die wahrscheinlich durch längere Lagerungszeiträume entstanden sind. Das Fehlen jeglicher Produkte ist vermutlich auf zwei Ursachen zurückzuführen. Einerseits könnten chaotrope Salze eine Verschlechterung des NCL-Prozesses verursacht haben. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da nachfolgende Ligationen mit Harnstoff und Guanidin die Ansätze nicht beeinträchtigten und die Löslichkeit leicht erhöhten. Andererseits könnten jegliche Thioester in den Ligrationsansätzen fehlen und nur freie Säure vorhanden sein. Trotz ähnlicher Konzentrationen der 7,3 kDa Bande in allen Ansätzen könnte es sein, dass der Umsatz überall gleich gut war. Jedoch wurde in Abschnitt 5.3.2 festgestellt, dass das Peptid-Thioesterverhältnis einen Einfluss auf die Ausbeute der NCL besitzt. Wahrscheinlicher ist, dass kein Thioester in den Ansätzen enthalten war und nur

freie Säure vorlag. Wie in 6.4 postuliert verändert sich die Zusammensetzung des Thioester über die Zeit durch Hydrolyse hin zu freier Säure. Die fehlende Unterscheidung in der SDS-Page zeigt, dass in den Ansätzen nur freie Säure vorhanden sein könnte. Massenspektrometrische Untersuchungen (Anhang B6) des Thioesters bestätigen diese Hypothese. Dies bestätigt, dass der Thioester sowohl der limitierende als auch fragilste Faktor der NCL ist. Außerdem kann aufgrund dieser Ergebnisse der Zusatz von chaotropen Salzen zur Verbesserung der Löslichkeit während der Ligation als nicht effektiv eingeschätzt werden.

6.4.4 NCL mit organischen Lösungsmitteln

Alternativ wurde den Ansätzen organische Lösungsmittel zugegeben. Diese erhöhen die Löslichkeit chemischer Verbindungen ohne diese zu verändern. Es wurden DMF und DMSO, als polare organische Lösungsmittel getestet. Beide NCL-Ansätze waren identisch bis auf die Zugabe der Lösungsmittel. Die Auswertung erfolgte per SDS-Page (Abb. 6). Die DMF-Zugabe, während der Ligation, führte nicht zur Bildung von Parvulin. Im Gegensatz dazu war die Verwendung von DMSO erfolgreicher. Allerdings ist DMSO nicht in der Lage, alle Reaktanten endgültig in Lösung zu halten. Sowohl das Produkt als auch die Reaktanten können im Präzipitat des Ansatzes nachgewiesen werden. Es konnte beobachtet werden, dass trotz der Zugabe von DMSO die Löslichkeit des Ansatzes mit der Zeit abnimmt. Der Thioester scheint stärker auszufallen als das Peptid. Dies ist an den Proben „ALL“ und „ÜS“ zu sehen. Parvulin ist schlechter löslich, da dieses ausschließlich in „DL“ zu finden ist. Diese Beobachtung erklärt sich mit der Bildung des Derivates. Das Parvulin-Derivat ist anscheinend nicht löslich und präzipitiert nach seiner Bildung. Somit verändert sich die Löslichkeit des Ansatzes. Ungeachtet dieser unvollständig löslichkeitsvermittelnden Wirkung ist DMSO geeignet, die Reaktanten länger in Lösung zu halten und damit die Ausbeute an Parvulin zu erhöhen.

Für das Verhältnis von Peptid zu Thioester ist 1:3 von den getesteten Verhältnissen am besten geeignet. Die Umesterung sollte bei einem pH-Wert von 7,5 und unter Verwendung von Thiophenol durchgeführt werden. Die Chargengröße sollte 100 µl plus DMSO als Lösungsmittel betragen. Mit diesem Ansatz wurde die verlässlichste Ausbeute erreicht und die Reinigungsstrategien damit durchgeführt.

6.5 Reinigungsstrategien

Trotz aller Optimierungen der NCL (Tab. H) konnte die Ausbeute an Parvulin-Derivat nur wenig erhöht werden. Um die Überprüfung der Aktivität durchzuführen, mussten die Edukte von dem Produkt getrennt werden. Im Zuge dieser Arbeit wurden hierbei mehrere

Reinigungsverfahren getestet. Diese beruhen auf verschiedenen physiochemischen Eigenschaften der NCL-Reaktanten (siehe 5.4).

6.5.1 Molekulargewicht/ Molekularvolumen

Die Trennung nach Molekulargewicht wurde mit Amicon^R-Filtereinheiten durchgeführt. Die Membranen dieser Filter bestehen aus Matrizen, welche definierte Porengrößen definiert als den sogenannten MWCO (*Molecular Weight Cut Off*) besitzen. Der MWCO gibt an, welche Peptide aufgrund ihres höheren Molekulargewichtes den Filter nicht passieren sollen. Dabei wird das Molekulargewicht und nicht das Volumen der Peptide angenommen. Jedoch wird hierbei vorausgesetzt, dass diese im nativen bzw. gefalteten Zustand sind. Lineare Peptide bzw. Proteine werden nicht berücksichtigt. Für die Reinigung wurde eine Filtereinheit mit einem *Cut Off* von 10.000 MW verwendet und die Lösung zentrifugiert. Der Erfolg wurde per SDS-Page festgestellt (Anhang B7). Im verwendeten Ansatz wurde DMSO hinzugegeben und per Urea (10 M) umgepuffert. Die Trennung über den Amicon^R-Filter war unwirksam. In Probe „Konz“ sind alle Reaktanten der NCL zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist im Durchlauf des Amicons^R kein Peptid/ Protein zu detektieren. Dies könnte daran liegen, dass die Filtermembran durch Salze (Urea) zugesetzt wurde, sodass keine Peptide oder Proteine durch die Membran gelangten. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die Filtergeschwindigkeit per Zentrifugation keine signifikante Änderung erfuhr. Eine weitere Möglichkeit ist, dass das Peptid und der Thioester, die durch die Membran diffundieren sollten, Strukturen gebildet haben, die der Größe eines 10 kDa großen Peptides entsprechen. Dies wäre durch die Bildung von Dimeren (vgl. Abb. 4) erklärt. Produkt bildet sich in Probe „All“. Hier wurde der Ansatz vor der Trennung aufgenommen. Die Reinigung über die Amicon^R-Filtereinheiten ist somit nicht erfolgreich. Eine Trennung per Molekulargewicht ist nicht möglich, da das Molekularvolumen zu ähnlich ist. Es müssen andere physikochemische Eigenschaften der Reaktanten für die Reinigung verwendet werden.

6.5.2 Polare Wechselwirkungen

Diese Trennung erfolgt aufgrund der Wechselwirkungen der elektrisch geladenen Seitenketten des Peptides. Ähnlich geladene Teilchen stoßen sich ab, ungleiche ziehen sich an. Dies kann durch die Verwendung eines Kationenenaustauschers ausgenutzt werden (siehe 5.4.2). Um die Ionenstärke bei der Probenauftragung möglichst gering zu halten, wurde der Ansatz (Abb. 6 - DMSO) in 5 mM HEPES verdünnt. Die anschließende Elution erfolgte durch Erhöhung der Ionenstärke (NaCl). Der pH-Wert der Lösungen betrug 8,2, was dem theoretischen pI-Wert des Peptides entspricht. Dadurch sollte eine Elution schon bei der

Auftragung stattfinden. Das Parvulin-Derivat und der Thioester besitzen ungefähr denselben pI-Wert. Diese können daher durch polare Wechselwirkungen nicht voneinander getrennt werden. Die Auswertung der SDS-Page (Abb. 7) zeigt, dass Thioester in Realität einen anderen pI besitzen muss. Sowohl Peptid als auch Thioester eluieren während der Probenauftragung von der Säule. Während des anschließenden Waschens wird zusätzlich Peptid eluiert. Thioester war zu diesem Zeitpunkt nicht auf der Säule gebunden. Nach Zugabe von 50 mM NaCl eluierte das Parvulin-Derivat. Da diese Bande direkt neben der Parvulin-Referenz liegt, kann Sie auf Diffundierung der Referenz zurückgeführt werden. Unterstützt wird dies dadurch, dass in Probe „TE“ eine Parvulinbande etwa gleicher Stärke erkennbar ist. Eine Diffusion von Parvulin würde gleichmäßig auf beiden Seiten stattfinden. Der verwendete Ansatz wurde bereits in 5.3.5 (Abb. 6) ausgewertet. Dabei präzipitierte Parvulin-Derivat. Gleiches könnte vor der Trennung mittels Kationenaustauscher geschehen sein. Peptide, welche nicht in Lösung sind, können nicht von der Säule eluieren. Dennoch birgt diese Reinigungsstrategie, aufgrund der genauen Anpassung der Ionensärke, das Potential, die Reaktanten der NCL zu trennen. Dazu müsste die Methodik angepasst werden. Hierfür muss die Ionenstärke beim Auftragen der Probe reduziert werden. Dazu kann beispielsweise eine geringere Konzentration an HEPES verwendet werden. Unpolare Lösungen sollten ebenso einen geringeren Effekt auf die Ionenstärke haben. Die Löslichkeit der Peptide in der Lösung müsste genauer untersucht werden. Organische Lösungsmittel wie DMSO können für diesen Zweck nicht verwendet werden, da sie die Wechselwirkung der Reaktanten mit der Säule verhindern.

6.5.3 Hydrophobizitäten

Diese Reinigungsmethode beruht auf der Hydrophobizität einzelner Peptide/ Proteine. Aminosäuren besitzen verschiedene Hydrophobizitäten [Rose, 1993] [Kyte et al, 1982]. Je nach Zusammensetzung der Peptide, sowie deren Struktur, entstehen so verschiedene Affinitäten für wässrige Lösungen. Hydrophobe Aminosäuren sind in der Regel im Inneren des Proteins, Hydrophile meist außen [Rose, 1993]. Diese physikalische Eigenschaft der Peptide wird ausgenutzt, um die Reaktanten der NCL mittels RP-HPLC und unter Verwendung verschiedener Säulen voneinander zu trennen. Die Auswertung erfolgte mittels SDS-Page (Abb. 8) (Anhang B8). Beide getesteten Säulen bestehen aus Silicagel mit unterschiedlich langen hydrophoben Alkylketten. Je kürzer diese Ketten, desto länger werden polare Analyten in der Phase zurückgehalten. Umgekehrt verhält es sich für unpolare Analyten. Zunächst wurde eine C18-Säule, welche geeigneter ist für unpolare Analyten

$-(\text{CH}_2)_{17}\text{-CH}_3$), getestet. Jedoch waren die Eigenschaften der Reaktanten zu ähnlich, um diese voneinander zu trennen. Im Produktsignal erscheinen beide Edukte (Anhang B8). Diese konnten in höhere ACN-Konzentration noch nachgewiesen werden. Mit einer C18-Säule ist somit keine Trennung möglich. Als Alternative wurde eine C8-Säule ($-(\text{CH}_2)_7\text{-CH}_3$) verwendet. Diese hält polare Analyten länger zurück und ist somit für die Trennung der Ligationsansätze besser geeignet. Der Thioester konnte von den restlichen Reaktanten getrennt werden (Abb. 8). In „41,6“ bis „43“ ist reiner Thioester zu sehen. „43,6“ enthält alle Reaktanten, wobei der Thioester nur ein geringes Signal besitzt. In „47,6“ eluierte der Thioester vollständig. Mithilfe einer genaueren Fraktionierung kann die genaue Abgrenzung von Thioester zu den restlichen Reaktanten ermittelt werden. Dies bedeutet, dass die Trennung per RP-HPLC (C8) geeignet scheint, um das Parvulin-Derivat zu reinigen. Peptid tritt zwischen „41,6“ bis „47,6“ in allen Fraktionen auf. Alle Ligationspeaks sind sehr schlecht auf dem Chromatogramm sichtbar. Jedoch zeigt die Auswertung per SDS-Page, dass die Säule mit Peptid und Thioester überladen wurde. Der scheinbare Verlust durch die Reinigung liegt an der schlechten Detektion des Parvulins im UV/Vis-Bereich. Für die Optimierung dieser Methode gibt es mehrere Möglichkeiten. Die Auftragskonzentration des Ansatzes kann verringert werden. Dadurch würden die Peaks schärfer, aber auch kleiner werden. Die Detektionsgrenze und Signalstärke der Reaktanten ist bereits trotz einer Überladung mit Probe gering, deshalb wäre von dieser Methode abzuraten. Eine Erhöhung der Temperatur sorgt für schnelleres Eluieren der Analyten von der Säule. Auch dies resultiert in schärferen Peaks. Eine Erniedrigung des Laufmittelgradienten kann zusätzlich erfolgen. Dadurch würden sich die Peaks verbreitern. Jedoch können somit mehr Fraktionen aufgefangen werden, was wiederum für eine genauere Trennung des Ligationsansatzes sorgt. Um die geringe Detektion des Parvulins zu verbessern, ist es möglich dieses *N*-terminal mit Fluoreszenzfarbstoffe zu modifizieren, wie beispielsweise Anthranilsäure oder Cumarin-Farbstoffe. Jedoch widerspricht dies dem Ziel, das Protein möglichst in seinem nativen Zustand zu halten und testen. Die Anwendung in der Diagnostik ist damit nicht vergleichbar. Die Verwendung einer C4 oder C2- Säule könnten durch ihre erhöhte Polarität für die Trennung zuträglich sein. Der Einsatz dieser Optimierungen sollte für eine verbesserte Trennung der Reaktanten sorgen und könnte eventuell eine Reinigung von beiden Edukten bewirken.

Von den getesteten Reinigungsmethoden ist die HPLC die Erfolgversprechendste für den Thioester. Durch ihre vielen Parameter ist sie flexibel anpassbar. Die Reinigung des Peptides sollte in einem Kationenaustauscher bzw. Anionenaustauscher erfolgen. Die sensitive

Anpassung der Ionenstärke sollte das Peptid von den restliche Reaktanten abtrennen können. Dafür sind Folgeversuche nötig.

6.6 Bestimmung der Aktivität

Durch die NCL konnte Parvulin-Derivat aus 5.3.5 generiert werden. Nach der Reinigung per Kationenaustauscher (Anhang C1) wurden geringe Mengen an Parvulin 10 gewonnen und auf Ihre Funktionalität überprüft. Zur Bestimmung der Aktivität wurde der durch FISCHER [Fischer et al, 1984] etablierte PPIase-Assay angewandt. Dieser erfordert sehr wenig PPIase um eine eindeutige Funktion des Parvulins nachzuweisen. Der Nachweis einer solchen Aktivität zeigt, dass durch Struktur-Wirkungsbeziehung ein funktionelles Parvulin vorhanden ist. Durch die Verwendung verschiedener Konzentrationen konnte eine lineare Abhängigkeit und damit der k_{cat}/k_m bestimmt werden. Dieser Assay wurde sowohl für das Wildtyp-Parvulin, als auch das Parvulin-Derivat Pf durchgeführt. Beide Werte wurden mit der Literatur [Fischer et al, 1984] verglichen (Tab. J). Alle Werte liegen in der gleichen Größenordnung. Die Aktivität von FISCHER von ist circa 1/3 höher als der Wildtyp. Dies könnte beispielsweise an den verschiedenen Substraten liegen, in denen sich die Versuchsdurchführungen unterscheiden. Das Parvulin-Derivat ist etwa halb so aktiv, wie der Wildtyp. Dies entspricht den Erwartungen. In das Derivat ist eine *D*-stereospezifische Aminosäure eingebaut, welche eine sterische Änderung des Proteins bewirkt haben könnte. Außerdem wäre es möglich, dass die Substitution der Aminosäure die Bindungsspezifität oder das katalytische Zentrum des Parvulins beeinflusst. All dies würde zu einer Verschlechterung der Aktivität führen. Dennoch ist die Aktivität im Parvulin-Derivat eindeutig nachweisbar. Somit ist die Faltung bzw. die Struktur des Parvulin-Derivates soweit der des Wildtyps und somit dem nativen Zustand entsprechend, dass eine Funktionsfähigkeit gegeben ist. Dies zeigt, dass eine *D*-Aminosäure durch ein halbsynthetisches Verfahren in Parvulin 10 eingebaut werden konnte und ein funktionelles Parvulin-Derivat erhalten wurde. Das somit erzeugte Substrat für *DHys* besitzt damit eine funktionelle Struktur. Daher sind weitere Versuche zur Validierung der diagnostischen Verwendung der *DHys*, sinnvoll.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen der Arbeit sollte ein Modell zur Evaluierung des diagnostischen Einsatzes von *D*-stereospezifischen Hydrolasen- und varianten generiert werden. Als Modell diente artifizielles Parvulin 10 mit einer substituierten *D*-Aminosäuren. Dadurch musste eine halb-synthetische Synthese mit Fragmenten erfolgen. Das *N*-terminale Fragment (1-67), auch Thioester genannt, wurde aus *E. coli* an einer fusionierten Intein-Chitinbindedomäne exprimiert. Mithilfe einer Kombination aus Affinitätschromatographie und verändertem Proteinspleißens konnte das Fragment an einer Chitinsäule zu einem Thioester umgebaut werden. Die erfolgreiche Expression und der Umbau mittels Proteinspleißens konnten dabei per SDS-Page erfolgreich nachgewiesen werden. In den *C*-terminalen Fragmenten (68-92), auch Peptide (Pf, Py, Pv) genannt, wurde jeweils eine *L*-Aminosäure per SPPS in eine *D*-Aminosäure substituiert. Diese Substitution ist für die Validierung der *DHys* erforderlich. Die Rohprodukte der SPPS konnten erfolgreich mittels präparativer HPLC gereinigt werden. Der Nachweis erfolgte mittels UPLC-MS. Durch eine anschließende initiale Hydrolysestudie der Peptide wurde die generelle Substratzugänglichkeit für die *DHys* belegt. Die Auswertung erfolgte per UPLC-MS. Nachfolgend wurden beide Substrate mittels natürlich chemischer Ligation verknüpft um Parvulin-Derivate zu erhalten. Die Überprüfung erfolgte per SDS-Pages. Die Hydrolyse des Thioesters begrenzte die Ausbeute sehr stark. Die höchste Ausbeute zeigten Ansätze mit Peptid-Thioester-Verhältnis von 1:3, Thiophenol und der Zugabe von DMSO als Lösungsmittel. Es wurde kein quantitativer Umsatz erreicht. Deshalb war eine Reinigung des Ansatzes nötig. Diese erfolgte aufgrund verschiedener physikalisch-chemischen Eigenschaften der Reaktanten, Molekulargewichten, polarer Wechselwirkungen und Hydrophobizitäten. Die Auswertung der Reinigungen erfolgte per SDS-Pages. Trennungen nach Hydrophobizität erwies sich am erfolgreichsten. Von dem gereinigten Parvulin-Derivat wurde die Aktivität mittels etabliertem Assay überprüft. Es konnte die Generierung von aktivem artifiziellem Parvulin bestätigt werden. Das Modellprotein konnte erfolgreich dargestellt werden und steht für eine weiterführende Untersuchung zur Validierung mit *D*-stereospezifischen Hydrolasen zur Verfügung.

8 Ausblick

Die Erstellung und Überprüfung des Modellproteins zur Evaluierung der *D*-Hydrolasen wurde im Rahmen der Arbeit erfolgreich durchgeführt. Die angewendeten Methoden sind geeignet, um weitere variabel veränderte Modellproteine zu erstellen. Jedoch sind weiterhin Optimierungen notwendig, um die Methoden erfolgreich anwenden zu können. Die NCL wurde weitestgehend optimiert. Das Problem der Löslichkeit konnte mittels einer Kombination aus Reduktion- und Lösungsmitteln behoben werden. Dennoch wurden nur geringe Ausbeuten erreicht. Das lag an der Limitation der Ausbeute durch die Konzentration an Thioester. Die Generierung des Thioesters gestaltet sich als schwierig. Da die eigentliche Thioestersynthese durch das Proteinspleißen, in wässriger Lösung erfolgt, hydrolysiert ein Teil des Esters zu freier Säure und ist somit für die NCL nicht nutzbar. Eine Überlegung wäre, statt des dafür benötigten Esters direkt das Peptid, welches *N*-terminal mit Cystein ein starkes Nukleophil besitzt, für das Proteinspleißen zu nehmen. Dadurch könnte die Hydrolyse des Thioesters verringert werden. Doch müsste man, wie auch bei einer Standard-NCL, auf Parameter wie Löslichkeit und pH-Wert achten, dennoch könnte dadurch die Ausbeute drastisch erhöht werden. Wenn kein quantitativer Umsatz gegeben ist, muss die Reinigungsstrategie angepasst werden. Die Trennung nach Hydrophobizität war am erfolgreichsten. Sie bietet mit der HPLC viele Anpassungsmöglichkeiten, welche getestet werden können. So sind Optimierungen der Lauftemperatur und des Laufmittelgradienten empfehlenswert, um eine genauere Trennung der Reaktanten zu begünstigen. Nachdem das Parvulin-Derivat erzeugt und auf Aktivität untersucht wurde, sollte die Untersuchung mittels *D*-Hydrolasen angeschlossen werden. So sollte eine Analyse der Zugänglichkeit von Parvulin als Substrat für die *DHys* erfolgen. Auch die Position der *D*-Aminosäure in der Tertiärstruktur kann einen Einfluss auf die Substratspezifität von den *DHys* haben. Die Auswirkung einer Proteinstruktur auf die Zugänglichkeit der Enzyme ist bedeutend. Vor allem, da somit der Einsatz als diagnostisches Mittel überprüft wird. Erkenntnisse und Herausforderungen, die bei der Generierung des Modellproteins Parvulin 10-Derivat auftreten, könnten für die Übertragung auf andere Modellproteine dienen. Eine erfolgreiche Prüfung der *DHys* mit dem Modellprotein würde den diagnostischen Einsatz dieser Enzyme stark fördern.

Literaturverzeichnis

- Asano, Y.; Ito, H.; Dairi, T.; Kato, Y. (1996) An Alkaline *D*-stereospecific Endopeptidase with β -Lactamase Activity from *Bacillus cereus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 271: 30256-30263
- Baca, M.; Muir, T.; Schnoelzer, M. et al (1995) Chemical Ligation of Cysteine-Containing Peptides: Synthesis of a 22 kDa Tethered Dimer of HIV-1 Protease. *Journal of the American Chemical Society*. 117: 1881-1887
- Becker, K. (2013) Charakterisierung neuartiger *D*-stereospezifischer Hydrolase *Bacillus thuringiensis serovar berliner*. 67. Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften, Masterarbeit
- Bentley, R. (2009): Ciral: A confusing etymology. *Chirality*. 22: 1-3
- Chen, L.; Kenyon, G.; Harayama, S. et al (1992) 4-Oxalocrotonate tautomerase, an enzyme composed of 62 amino acid residues per monomer. *Journal of Biological Chemistry*. 267: 17716-17721
- Choi, D.; Koh, J.; Peters, S. (1988) Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *Journal of Neuroscience*. 8: 185-196
- Corrigan, J. (1969) *D*-Amino Acids in Animals. *Science*. 164: 142-149
- Cullis, P.; Wolfenden, R. (1981) Affinities of Nucleic Acid Bases for Solvent Water. *Biochemistry*. 20: 3024-3028.
- D'Aniello, A. (2007) *D*-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain Research Reviews*. 53: 215-234
- D'Aniello A.; Cosmo, A.; Cristo, C.; Annunziato, L.; Petrucelli, L.; Fisher, G. (1996) Involvement of *D*-Aspartic acid in the synthesis of testosterone in rat testes. *Life Sciences*. 59: 97-104
- D'Aniello, A.; D'Onofrio, G.; Pischetola, M. et al (1993) Biological role of *D*-amino acid oxidase and *D*-aspartate oxidase. Effects of *D*-amino acids. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 26941-26949
- D'Aniello, A.; Vetere, A.; Fisher, G.; Cusano, G.; Chavez, M.; Petrucelli, L. (1992) Presence of *D*-alanine in proteins of normal and Alzheimer human brain. *Brain Research*. 592: 44-48

- Dawson, P.; Kent, S. (2000) Synthesis of native proteins by chemical ligation. Annual Review of Biochemistry. 69: 923-960
- Dawson, P.; Muir, T.; Clark-Lewis, I. Et al (1994) Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Nature. 266: 776-779
- Diessner, A. (2016) Untersuchung der putativen Substratbindungsstelle von *Escherichia coli* Parvulin 10. 167. Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften, Dissertation
- Dong, X.; Wang, Y.; Qin, Z. (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. Acta Pharmacol Sinica. 30: 379-387
- Dunlop, D.; Niedle, A.; McHale, D.; Dunlop, D.; Lajtha, A. (1986) The presence of free *D*-aspartic acid in rodents and man. Biochemical and Biophysical Research Communications. 141: 27-32
- Fischer, G.; Bang, H.; Mech, C. (1984) Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. Biomed Biochem. Acta. 43: 1101-1111
- Fujii, N. (2002) *D*-amino acids in living higher organisms. Origins of Life and Evolution of the Biosphere. 32: 103-127
- Furuchi, T.; Homma, H. (2005) Free *D*-aspartate in mammals. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 28: 1566-1570
- Genchi, G. (2017) An overview on *D*-amino acids. Amino Acids. 49: 1521-1533
- Hamase, K.; Morikawa, A.; Ohgusu, T.; Lindner, W.; Zaitso, K. (2007) Comprehensive analysis of branched aliphatic *D*-amino acids in mammals using an integrated multi-loop two-dimensional column-switching high-performance liquid chromatographic system combining reversed-phase and enantioselective columns. Journal of Chromatography. 1143:105-111
- Han, H.; Miyoshi, Y.; Ueno, K.; Okamura, C.; Tojo, Y.; Mita, M.; Lindner, W.; Zaitso, K.; Hamase, K. (2011) Simultaneous determination of *D*-aspartic acid and *D*-glutamic acid in rat tissues and physiological fluids using a multi-loop two-dimensional HPLC procedure. Journal of Chromatography. 879: 196-202
- Hartig, L. (2018) Entwicklung und Etablierung einer Screening- Plattform zur Bestimmung der Substratspezifität *D*-Aminosäurespezifischer Proteasen. 92. Halle, Martin-Luther-

Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften,
Masterarbeit

Hashimoto, A.; Nishikawa, T.; Oka, T.; Hayashi, T.; Takahashi, K. (1993) Widespread distribution of free *D*-aspartate in rat periphery. *FEBS Letter*. 331: 4-8

Hennig, L.; Christner, C.; Schelbert, B. et al (1998) Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases by juglone. *Biochemistry*. 27: 5953-5960

Ishii, C.; Miyamoto, T.; Ishigo, S. et al (2017) Two-Dimensional HPLC-MS/MS Determination of Multiple *D*-Amino Acid Residues in the Proteins Stored Under Various pH Conditions. *Chromatography*. 38: 65-72

Jayakumar, A.; Tai, M.; Huang, W. et al (1995) Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92: 8695-8699

Jähnert, F. (2015) Kinetische Charakterisierung *D*-stereospezifischer Hydrolase-Varianten. 100. Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften, Masterarbeit

Kent, S. (1988) Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 957-989

Khoury, G.; Baliban, R.; Flouda, C. (2011) Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Scientific Reports*. 1:90: 1-5

Konno, R.; Bruckner, H.; Dániello, A.; Fisher, G.; Fujii, N. (2009) *Nova*. 3:

Kögl, F. (1949) Chemische und biologische Untersuchungen über Tumorproteine. *Experienta*. 5: 173-180

Köhn, M.; Breinbauer, R. (2004) The Staudinger ligation-a gift to chemical biology. *Angewandte Chemie*. 43: 3106-3016

Krebs, H. (1935) Metabolism of amino-acids. *Biochemical Journal*. 29: 1951-1969

Kühlewein, A.; Voll, G.; Alvarez, B. et al (2004) Solution structure of *Escherichia coli* Par10: The prototypic member of the Parvulin family of peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases. *Protein Science*. 13: 2378-2387

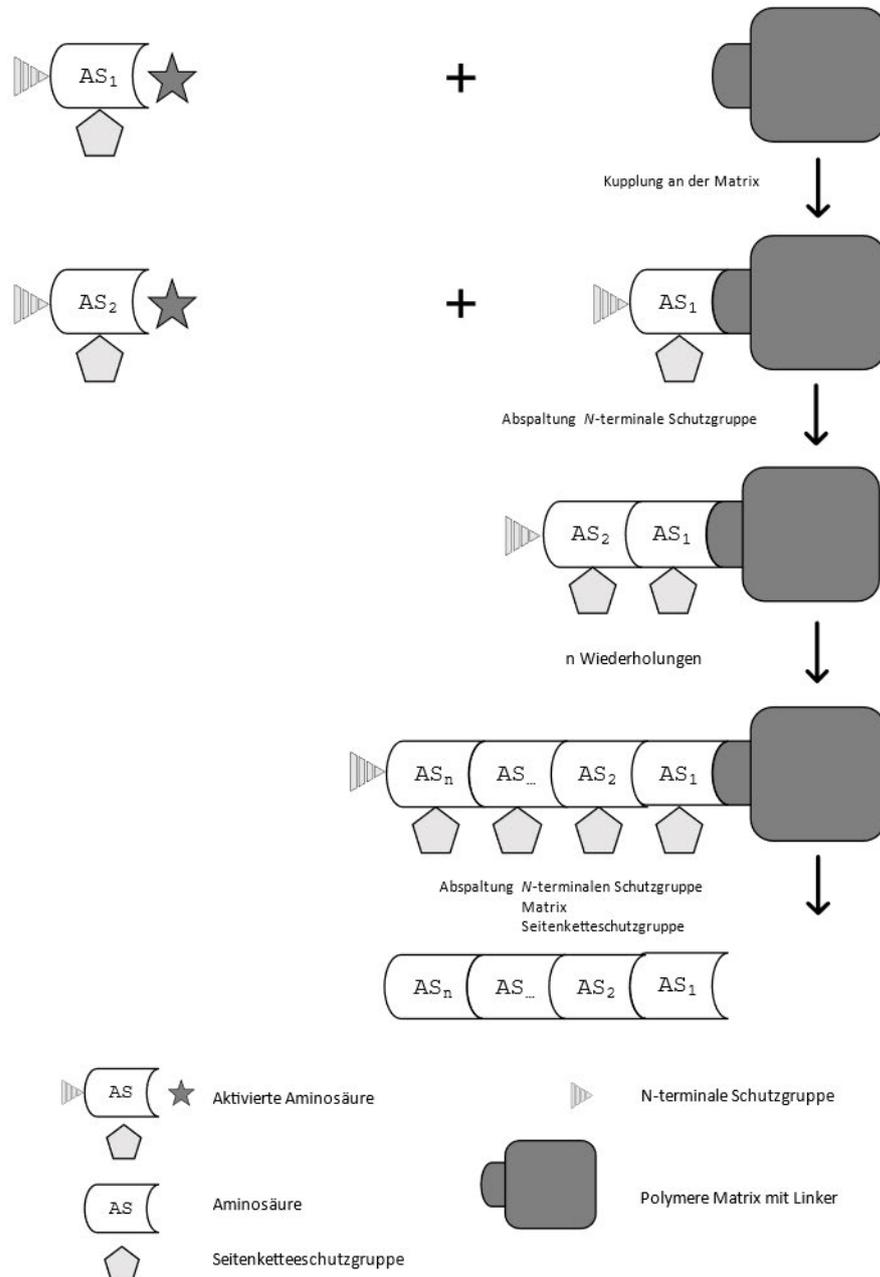
Kyte, J.; Doolittle, R. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*. 157: 105-132.

- Laemmli, U. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Landrieu, I.; Wieruszkeski, J.; Wintjens, R. et al (2002) *Journal of Molecular Biology*. 320: 321-332
- Liebscher, S. (2008) *N- und C-terminale Modifizierung von Polypeptiden und Proteinen*. 125. Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften, Dissertation
- Lössl, P. (2010) *Untersuchungen zur Substratspezifität der alkalinen D -Peptidase*. 52 Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften, Bachelorarbeit
- Maeda, H.; Takata, T.; Fujii, N et al (2014): Rapid Survey of Four Asp isomers in Disease-Related Proteins by LC-MS combined with Commercial Enzymes. *Analytical Chemistry*. 87.
- Masters, P.; Bada, J.; Zigler, J. (1977) Aspartic acid racemisation in the human lens during ageing and in cataract formation. *Nature*. 268: 71-73
- Merrifield, R. (1963) Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*. 85: 2149-2154
- Miyoshi, Y.; Hamase, K.; Tojo, Y.; Mita, M.; Konno, R.; Zaitso, K. (2009) Determination of *D*-serine and *D*-alanine in the tissues and physiological fluids of mice with various *D*-amino-acid oxidase activities using two-dimensional high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography*. 877: 2506-2512
- Montecucchi, P.; Hneschen, A. (1981) Amino acid composition and sequence analysis of sauvagine, a new active peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *International Journal of Peptide and Protein Research*. 18: 113-120
- Morikawa, A.; Hamase, K.; Zaitso, K. (2003) Determination of *D*-alanine in the rat central nervous system and periphery using column-switching high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 312: 66-72
- Morishita, F.; Nakanishi, Y; Kaku, S. et al (1997) A novel *D*-amino-acid-containing peptide isolated from *Aplysia* heart. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 240: 354-358

- Müller, J. (2021) indirekte Korrespondenz über Dr. rer. nat. Sandra Liebscher. Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften,
- Nagata, Y.; Sato, T.; Enomoto, N.; Ishii, Y.; Sasaki, K.; Yamada, T. (2007) High concentrations of *D*-amino acids in human gastric juice. *Amino Acids*. 32: 137-140
- Nesterenko, M.; Tilley, M.; Upton, S. (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minutes detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 28: 239-242.
- Neuberger, A. (1948) Stereochemistry of Aminoacids. *Advances in Protein Chemistry*. 4. 297-383.
- Neuhoff, V.; Stamm, R.; Eibl, H. (1985) Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 6: 427-448
- Newcomer, J.; Farbner, N.; Olney, J. (2000) NMDA receptor function, memory, and brain aging. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2:3 : 219-232
- Ollivaux, C.; Soye, D.; Toullec, J. (2014) Biogenesis of *D*-amino acid containing peptides/proteins: where, when and how?. *Journal of Peptide Science*. 20(8): 595-612
- Pech, A. (2011) Einsatz nativer Proteasen zur stereoselektiven Synthese von *L*- und *D*-konfigurierten Proteinen. 166. Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften, Dissertation
- Perler, F. (2005) Protein Splicing Mechanisms and Applications. *IUBMB Life*. 57(7): 469-476.
- Perler, F.; Xu, M.; Paulus, H. (1997) protein splicing and autoproteolysis mechanismus. *Current Opinion in Chemical Biology*. 1: 292-299.
- Piubelli, L.; Giulia, M.; Valentina, R.; Loredano, P. (2021) The Role of *D*-Amino Acids in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 80: 475-492
- Pollegioni, L.; Piubelli, L.; Sacchi, S. et al (2007) Physiological functions of *D*-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64: 1373-1394
- Pöttgen, L. (2019) Darstellung und kinetische Charakterisierung modifizierter und neuartiger *D*-stereospezifischer Peptidasen. 100. Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften, Masterarbeit

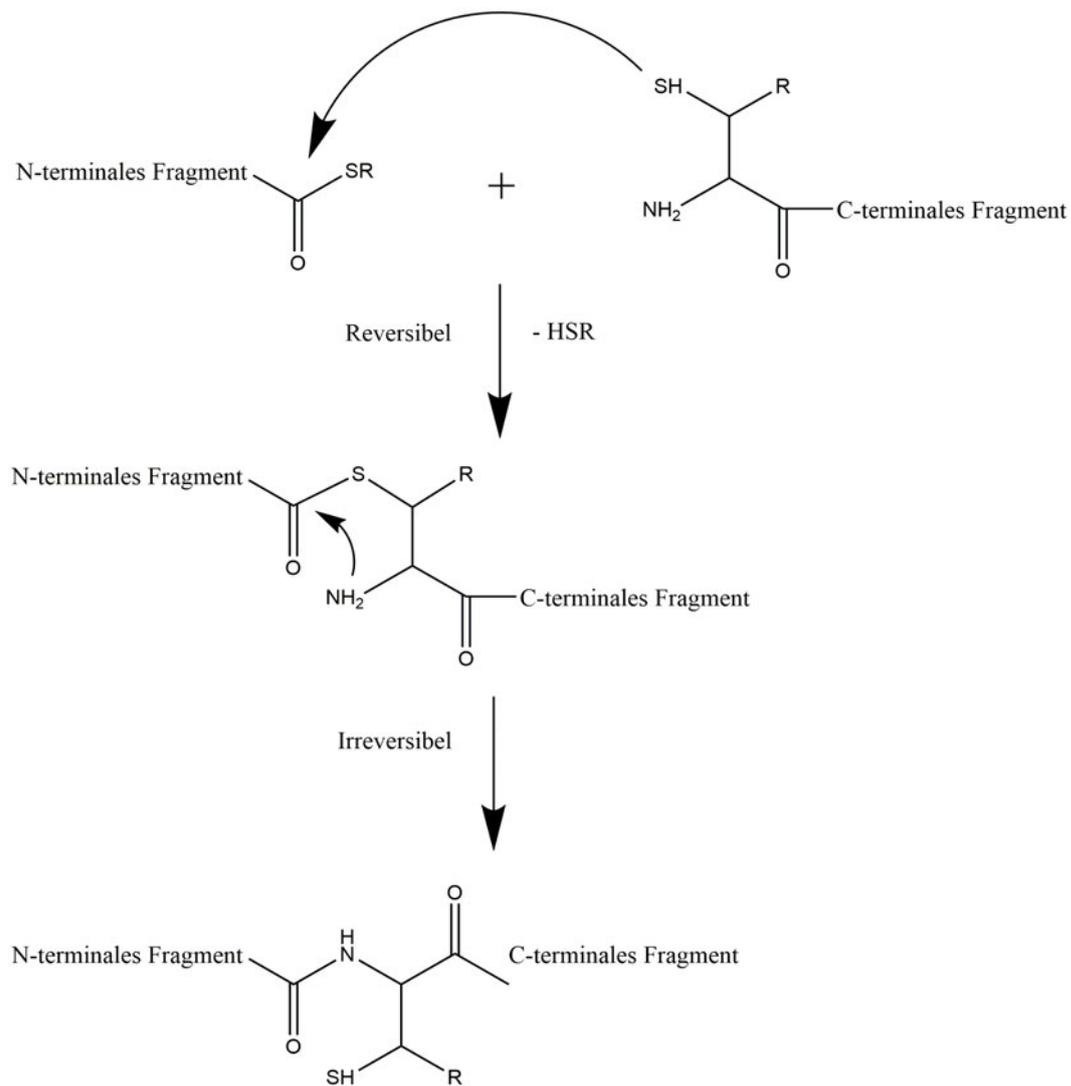
- Powell, J.; Vine, N.; Crossman, M. (1992) On the accumulation of *D*-aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta. *Atherosclerosis*. 97: 201-208
- Rahfeld, J.; Rücknagel, K.; Scelbert, B. et al (1994) Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS Letter*. 352: 180-184
- Rahfeld, J.; Schierhorn, A.; Mann, K. et al (1994) A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Letter*. 343: 65-69
- Rangasamy, V.; Mishra, R.; Sondarva, G. et al (2012) Mixed-lineage kinase 3 phosphorylates prolyl-isomerase Pin1 to regulate its nuclear translocation and cellular function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109: 8149-8154
- Rentzsch, A. (2008) Untersuchungen der molekularen Wechselwirkung von Aryl-1-indanylketonen mit Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen. 62. Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften, Diplomarbeit
- Roher, A.; Lowenson, J.; Clarke, S. et al (1993) Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 3072-3083
- Rose, George D. (1993): Hydrogen Bonding, Hydrophobicity, Packing, and Protein Folding. *Annual Review of Biophysics, Biomolecular Structures*. 22: 381-415.
- Ryo, A.; Liou, Y.; Lu, K. et al (2003) Prolyl isomerase Pin1: a catalyst for oncogenesis and a potential therapeutic target in cancer. *Journal of Cell Science*. 116: 773-783
- Schell, M.; Molliver, M.; Snyder, S. (1995) *D*-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92: 3948-3952
- Saleh, L.; Perler, F. (2006) Protein Splicing *In Cis* and *In Trans*. *The Chemical Record*. 6: 183-193.
- Scholz, C.; Rahfeld, J.; Fischer, G.; Schmid, F. (1997) Catalysis of protein folding by parvulin. *Journal of Molecular Biology*. 273: 753-762
- Sewald, N.; Jakubke, H. (2009) *Peptides: Chemistry and Biology*. 2. Wiley.

- Simon, A: (2021) Screening und Charakterisierung *D*-Aminosäure-spezifischer hydrolytischer Enzyme. 157. Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften, Dissertation
- Simon, A.; Liebscher, S. (2019) Application of a Dual Internally Quenched Fluorogenic Substrate in Screening for *D*-Arginine Specific Proteases. *Frontiers in Microbiology*. 10: 711
- Takahashi, S. Ogasawara, H.; Hiwatashi, K. et al (2006) Paenidase, a Novel *D*-Aspartyl Endopeptidase from *Paenibacillus* sp. B38: Purification and Substrate Specificity. *The Journal of Biochemistry*. 139: 197-202.
- Thanzeel, F.; Wolf, C. (2017) Substratspezifische Analyse von Aminosäuren mit Sensoren für *D/L*-Cystein: umfassende stereochemische Untersuchungen in wässriger Lösung. *Angewandte Chemie*. 129: 7382-7387
- Topo, E.; Soricelli, A.; D'Aniello, A.; Ronsini, S.; D'Aniello, G. (2009) The role and molecular mechanism of *D*-aspartic acid in the release and synthesis of LH and testosterone in humans and rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 7: 1-11
- Voet, D.; Voet, J.; Charlotte, W. (2018): *Voet's Principles of Biochemistry*. 5. Auflage: Wiley Verlag.
- Wolosker, H.; Sneth, K.; Takahashi, M.; Mothet, J.; Brady, R.; Ferris, C.; Snyder, S. (1999) Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator *D*-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 721-725
- Yaffe, M.; Schutkowski, M.; Shen, M. et al (1997) Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science*. 278: 1957-1960
- Yoshimura, T.; Nishikawa, T.; Homma, H. (2016) *D*-Amino Acids – Physiology, Metabolism and Application Springer. 1:
- Zhang, Z.; Liu, Y.; Liu, P.; Yang, L. (2017) Non-invasive detection of gastric cancer relevant *D*-amino acids with luminescent DNA/silver nanoclusters. *Nanoscale*. 9
- URL1 (16/05/2022): P0A9L5 · PPIC_ECOLI.
URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0A9L5/entry>

Anhang**Anhang A****A1: Festphasenpeptidsynthese****A 1: schematischer Ablauf der SPPS**

Die C-terminale Aminosäure wird über einen Linker an eine polymere Matrix gekoppelt. Anschließend erfolgt die N-terminale Abspaltung der Schutzgruppe. Die nächste Aminosäure wird gekuppelt und N-Terminal entschützt. Dies wird zyklisch wiederholt. Nach Synthese wird das Peptid von der Matrix abgespalten und die Seitenkettengruppen können freigegeben werden

A2: Natürlich Chemische Ligation (NCL)



A 2: Schematischer Verlauf der NCL [Chemdraw]

Dargestellt ist der Reaktionsverlauf der Nativen Chemischen Ligation. Zuerst kommt es zum nukleophilen Angriff der Sulphydylgruppe an das Carbonyl-C-Atom und damit zur Umesterung. Im zweiten Schritt kommt es zur *S-N*-Umlagerung und damit zur Ausbildung einer Peptidbindung. X=S

Anhang B

B1: die theoretischen Massen der Peptide sowie ihre mehrfach geladenen Spezies

B 1: theoretische Massen der Peptide und seine mehrfach geladenen Spezies

Ladung	Fragmentgröße [M + nH] ⁿ⁺	Peptid Pf
1x [M + H]	+	2897,4
2x [M + 2 H]	2+	1449,2
3x [M + 3 H]	3+	966,5
4x [M + 4 H]	4+	725,1

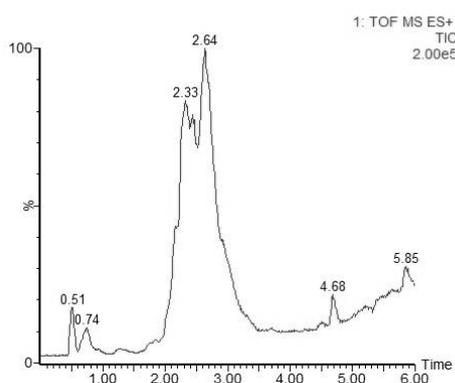
Ladung	Fragmentgröße [M + nH] ⁿ⁺	Peptid Py
1x [M + H]	+	2897,4
2x [M + 2 H]	2+	1449,2
3x [M + 3 H]	3+	966,5
4x [M + 4 H]	4+	725,1

Ladung	Fragmentgröße [M + nH] ⁿ⁺	Peptid Pv
1x [M + H]	+	2833,3
2x [M + 2 H]	2+	1417,2
3x [M + 3 H]	3+	945,1
4x [M + 4 H]	4+	709,1

B2: Chromatogramme und Massenspektren vor und nach der HPLC-Reinigung

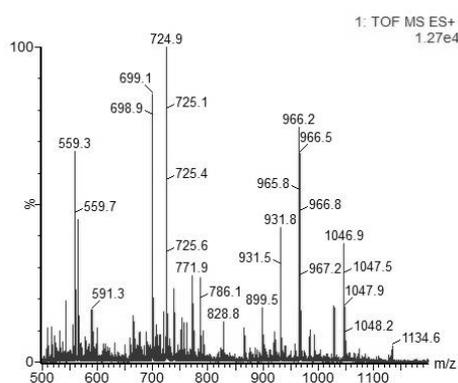
A

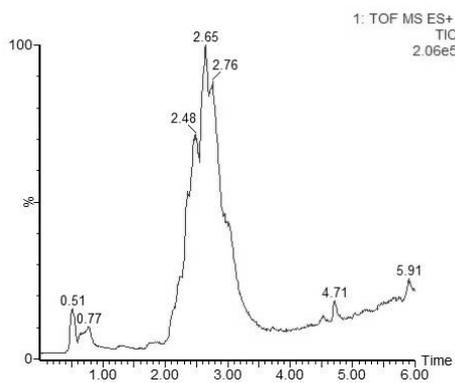
Pf (F81f)



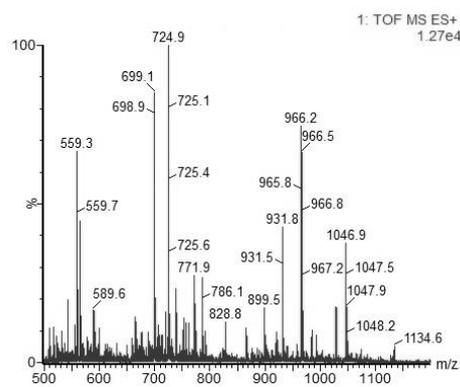
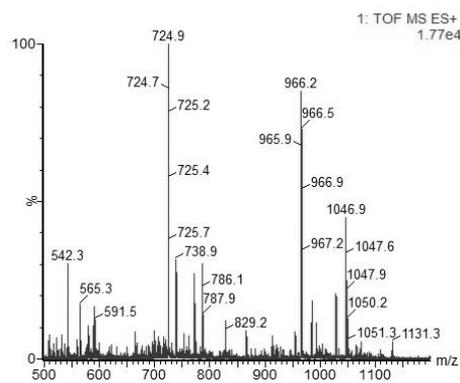
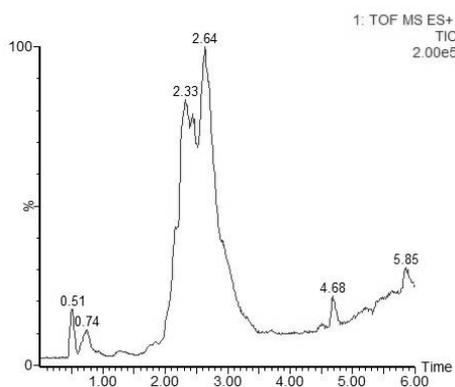
Py (Y83y)

B

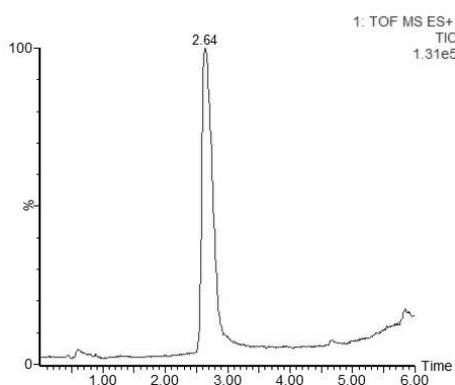




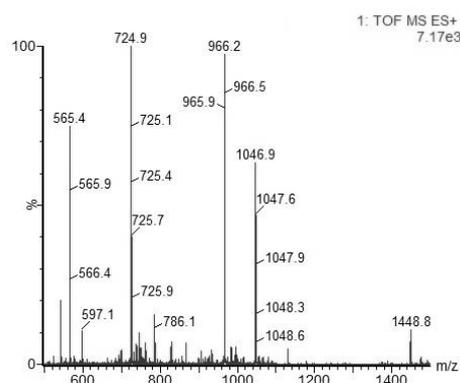
Pv (Y81v)

**Abb. 5.1.1: UPLC-MS Analyse der synthetisierten Peptide**

Abgebildet sind das Chromatogramme der mittels Festphasenpeptidsynthese synthetisierten Peptide, sowie die massenspektrometrische Analyse dieser. A) Chromatogramm: Auftragung der relativen Häufigkeit der Massen (%) gegen die Zeit (min). B) Spektrum: Auftragung der relativen Häufigkeit (%) der Massen gegen das Ladungsmasseverhältniss (m/z). Messbedingungen: Lösungsmittelgradienten 5-100 % ACN/H₂O (0,1 % TFA); 5 min; 0,3 ml/min; 30 °C

A
Pf (F81f)

Py (Y83y)

B

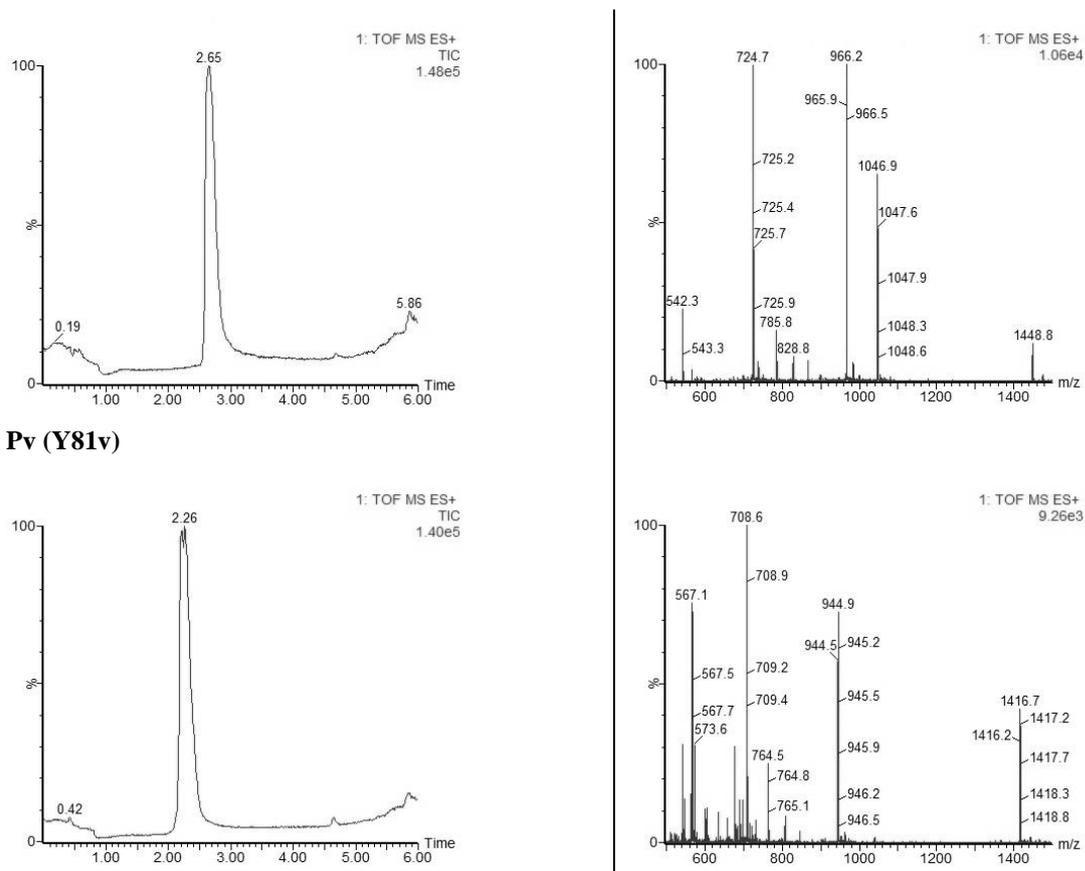


Abb. 5.1.2: Chromatographische Reinigung und UPLC-MS-Analyse der synthetisierten Peptide

Abgebildet sind das Chromatogramme der gereinigten Peptide, sowie die massenspektrometrische Analyse dieser. A) Chromatogramm: Auftragung der relativen Häufigkeit der Massen (%) gegen die Zeit (min). B) Spektrum: Auftragung der relativen Häufigkeit (%) der Massen gegen das Ladungsmasseverhältnis (m/z). Messbedingungen: Lösungsmittelgradienten 5-100 % ACN/H₂O (0,1 % TFA); 5 min; 0,3 ml/min; 30 °C

B3: Theoretisch berechnete C-terminale Fragmentgrößen, nach der Hydrolyse durch die DHys

Tab. B3: Spaltprodukte der Peptide nach enzymatischer Spaltung

Ladung	Fragmentgröße [Da]	
	N-terminal; 14 AS; C-f	C-terminal; 11 AS; G-N
Peptid Pf		
	1x	1539,8
	2x	770,4
	3x	513,9
	4x	385,7
Ladung	Fragmentgröße [Da]	
	N-terminal; 16 AS; C-y	C-terminal; 9 AS; H-N
Peptid Py		
	1x	1760,0
	2x	880,5
	3x	587,3
	4x	440,8
Ladung	Fragmentgröße [Da]	

Peptid Pv	N-terminal; 16 AS; C-v	C-terminal; 9 AS; H-N	
	1x	1696,0	1156,4
	2x	848,5	578,7
	3x	566,0	386,1
	4x	424,7	289,9

B4: Aufgefundene Spaltprodukte in den Signalen der Chromatogramme und Massenspektren

Peptid Pf

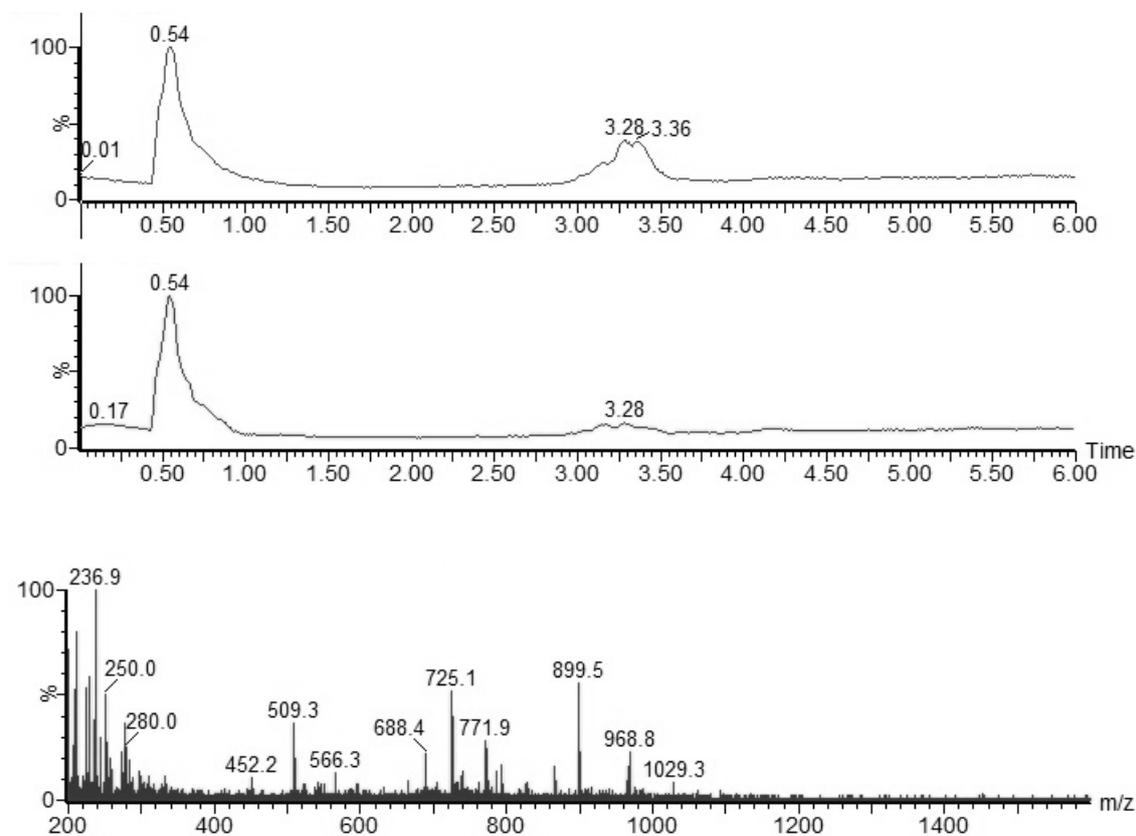


Abb.: Hydrolyse Peptid Pf durch DHy1: Es lassen sich Spaltprodukte bei 688,4 und 771,9 m/z finden. Hydrolysebedingungen: 0,1 M NaHPO₄; 100 μM Peptid; 1 μM Enzym pH 8, 30 °C 550 rpm. Messbedingungen: UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).

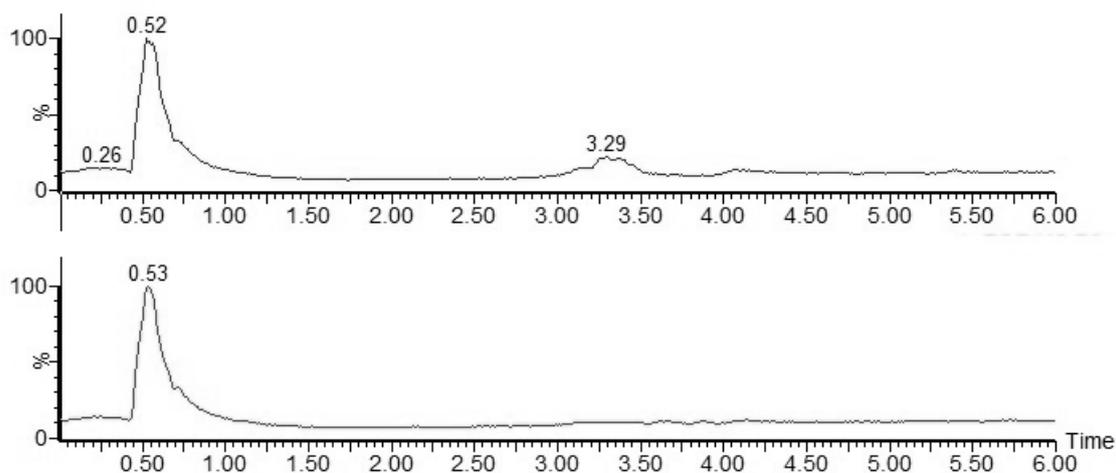


Abb.: Hydrolyse Peptid Pf durch DHy2: Es lassen sich keine Spaltprodukte finden. Hydrolysebedingungen: 0,1 M NaHPO₄; 100 µM Peptid; 1 µM Enzym pH 8, 30 °C 550 rpm. Messbedingungen:UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).

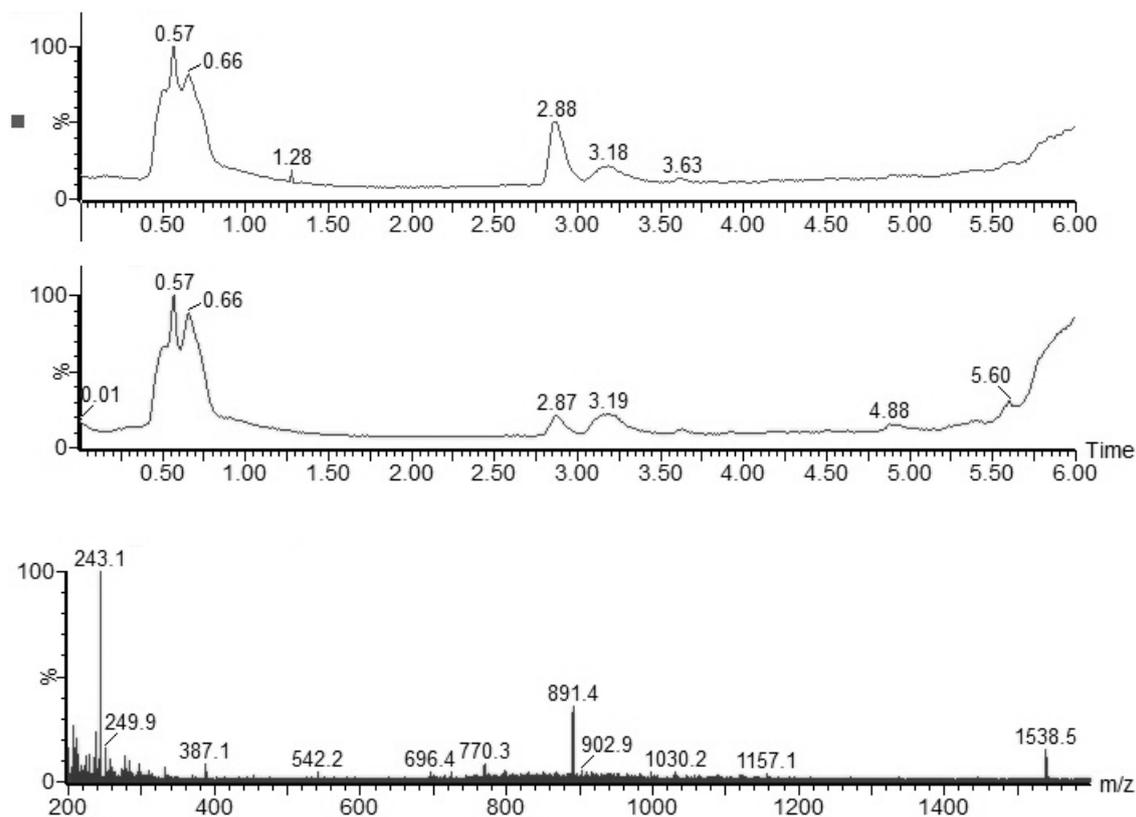


Abb.: Hydrolyse Peptid Pf durch DHy3: Es lassen sich Spaltprodukte bei 770,3 und 1538,5 m/z finden. Hydrolysebedingungen: 0,1 M NaHPO₄; 100 µM Peptid; 1 µM Enzym pH 8, 30 °C 550 rpm. Messbedingungen:UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).

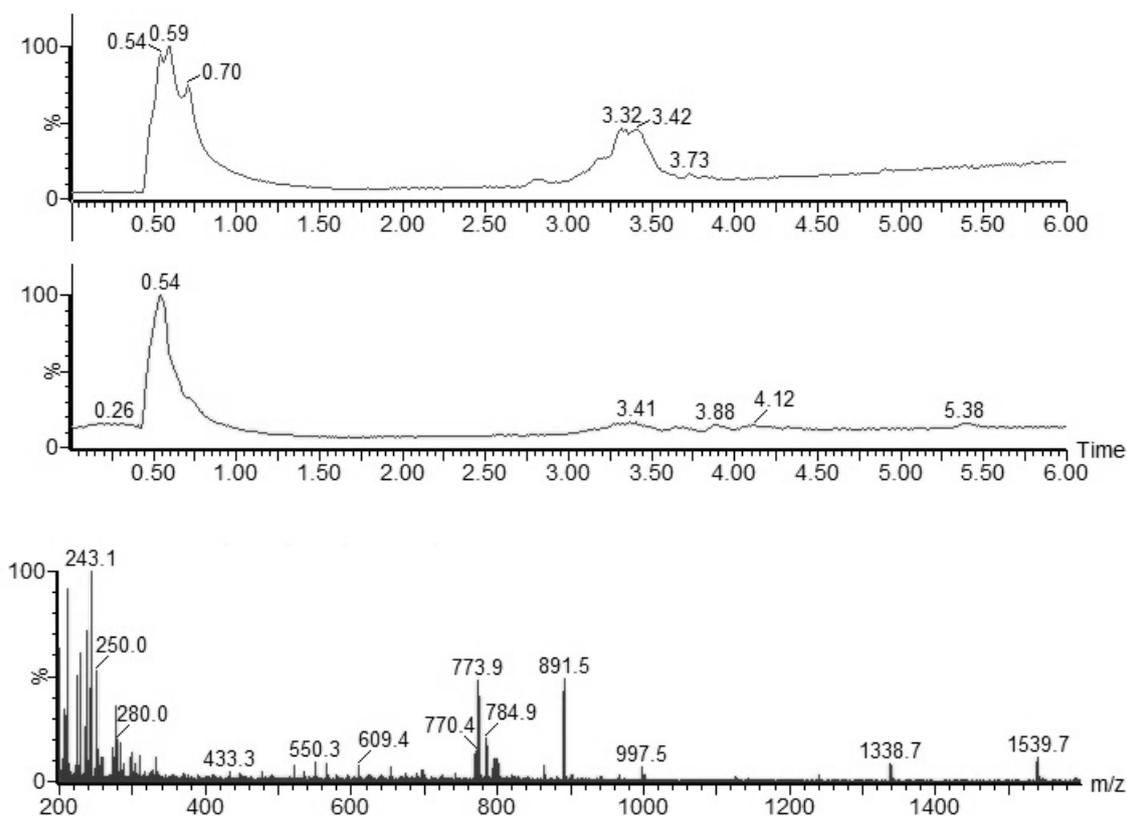


Abb.: Hydrolyse Peptid Pf durch DHy4: Es lassen sich Spaltprodukte bei 770,4 und 1539,7 m/z finden. Hydrolysebedingungen: 0,1 M NaHPO₄; 100 µM Peptid; 1 µM Enzym pH 8, 30 °C 550 rpm. Messbedingungen:UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).

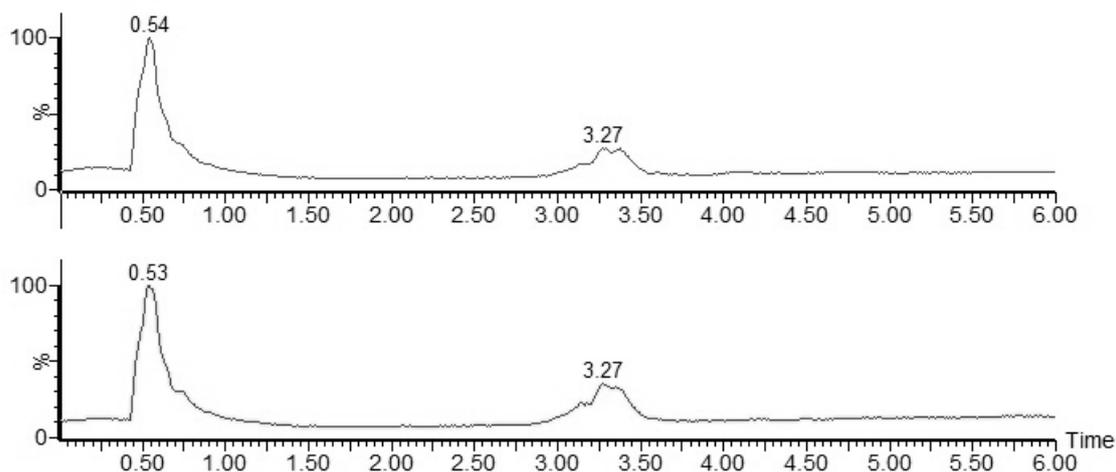


Abb.: Hydrolyse Peptid Pf durch pbp5: Es lassen sich keine Spaltprodukte finden. Hydrolysebedingungen: 0,1 M NaHPO₄; 100 µM Peptid; 1 µM Enzym pH 8, 30 °C 550 rpm. Messbedingungen:UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).

Peptid Py

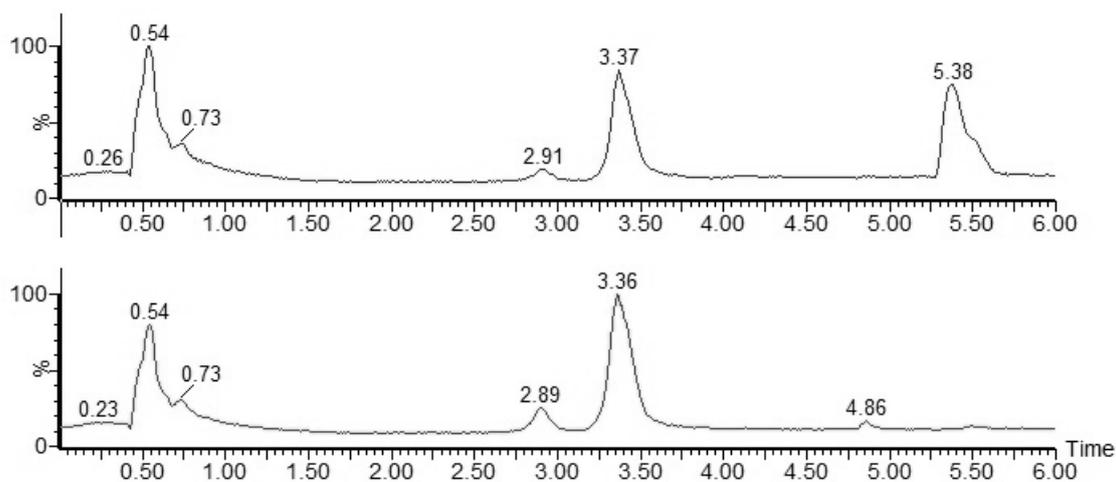


Abb.: Hydrolyse Peptid Py durch DHy1: Es lassen sich keine Spaltprodukte finden. Hydrolysebedingungen: 0,1 M NaHPO₄; 100 µM Peptid; 1 µM Enzym pH 8, 30 °C 550 rpm. Messbedingungen:UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).

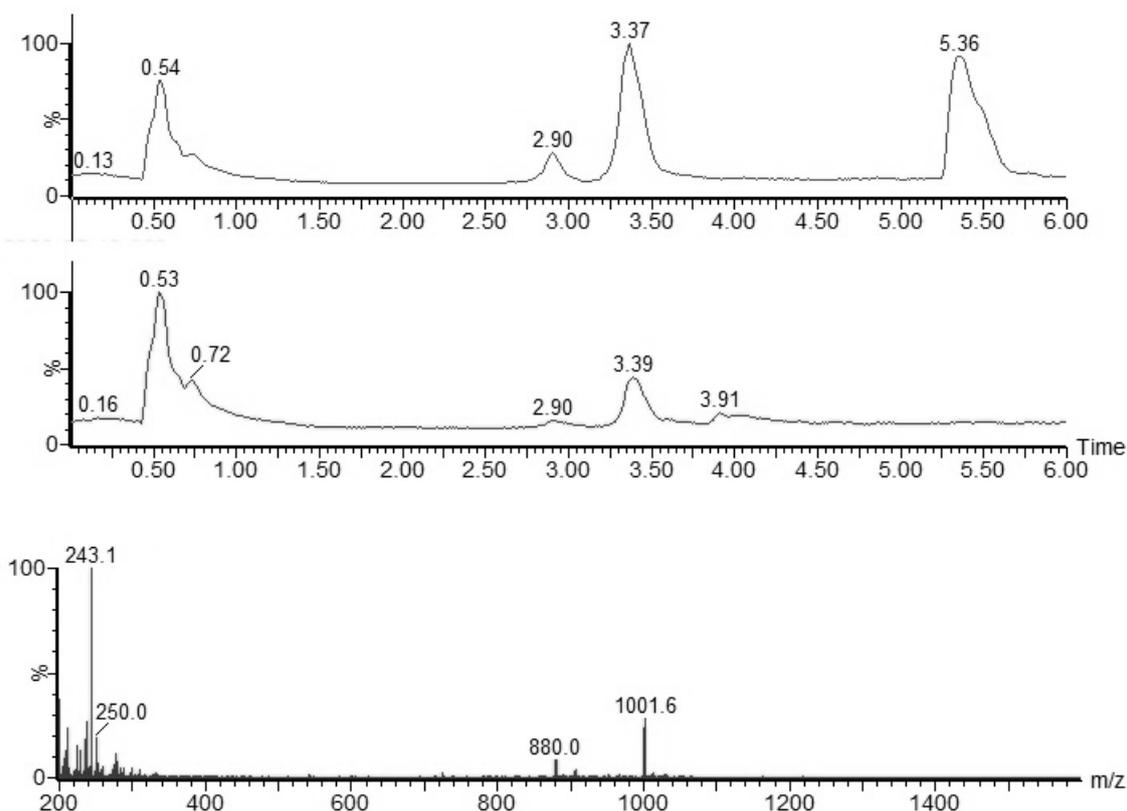


Abb.: Hydrolyse Peptid Py durch DHy2: Es lassen sich Spaltprodukte bei 880,0 m/z finden. Hydrolysebedingungen: 0,1 M NaHPO₄; 100 µM Peptid; 1 µM Enzym pH 8, 30 °C 550 rpm. Messbedingungen:UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).

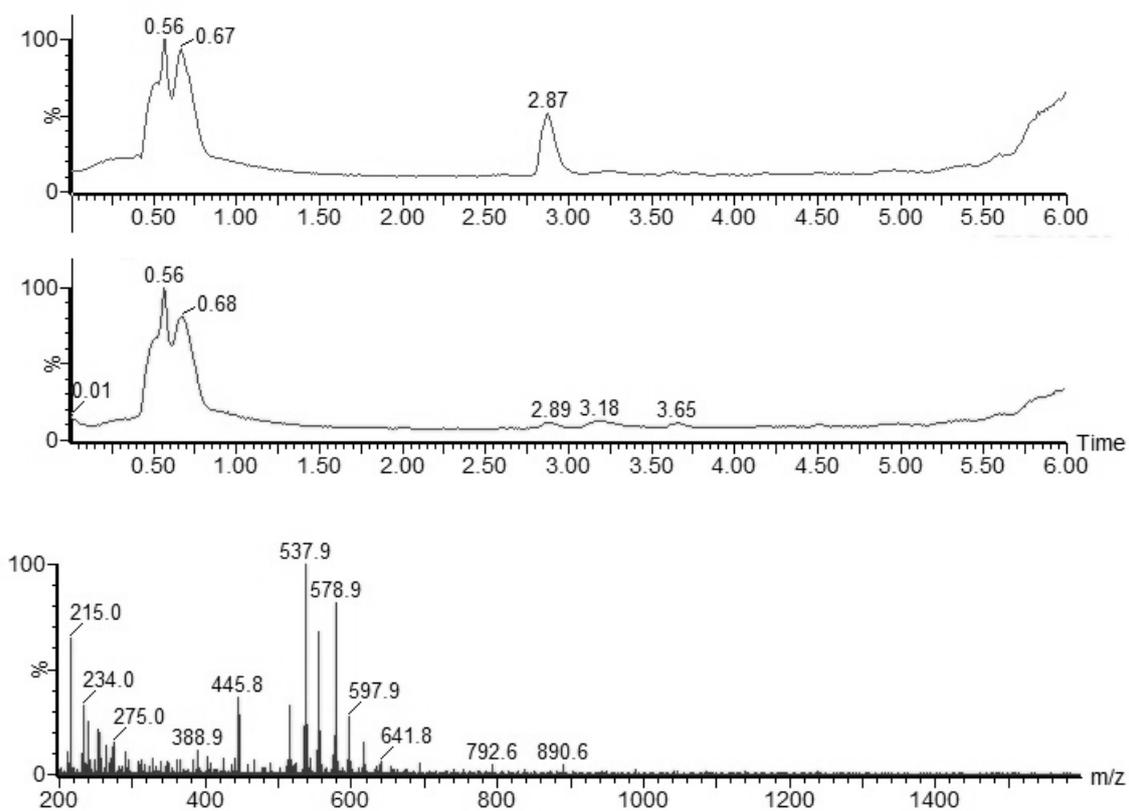
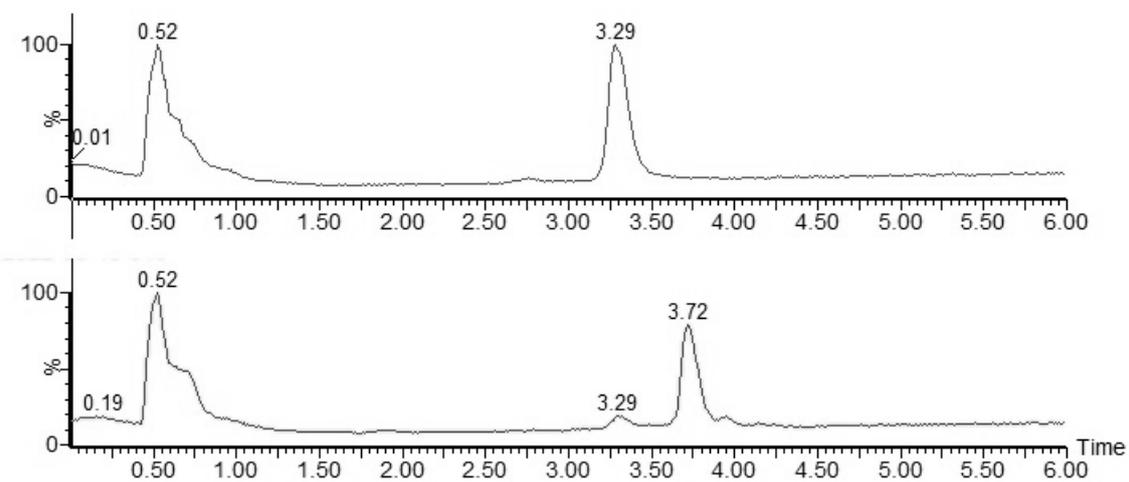


Abb.: Hydrolyse Peptid Py durch DHy3: Es lassen sich Spaltprodukte bei 578,9 m/z finden. Hydrolysebedingungen: 0,1 M NaHPO₄; 100 μM Peptid; 1 μM Enzym pH 8, 30 °C 550 rpm. Messbedingungen: UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).



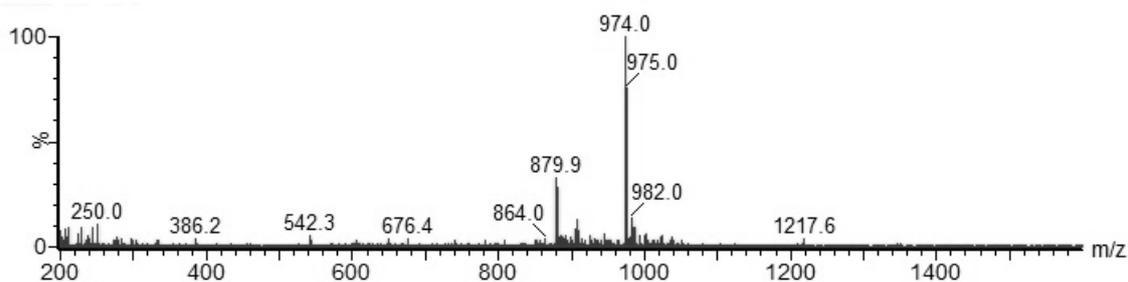


Abb.: Hydrolyse Peptid Pv durch DHy4: Es lassen sich Spaltprodukte bei 879,9 m/z finden. Hydrolysebedingungen: 0,1 M NaHPO₄; 100 μM Peptid; 1 μM Enzym pH 8, 30 °C 550 rpm. Messbedingungen:UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).

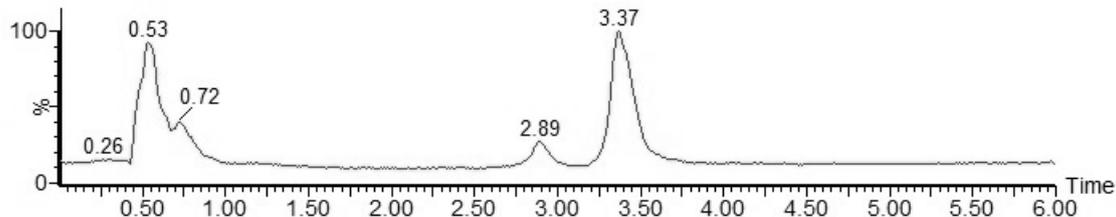
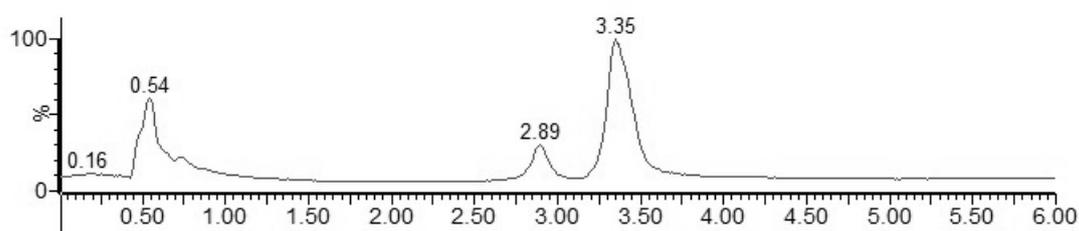
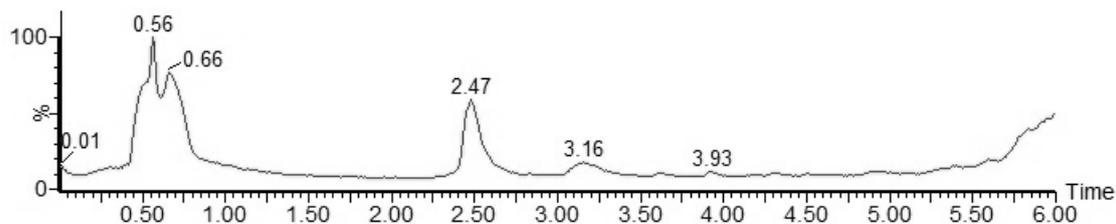
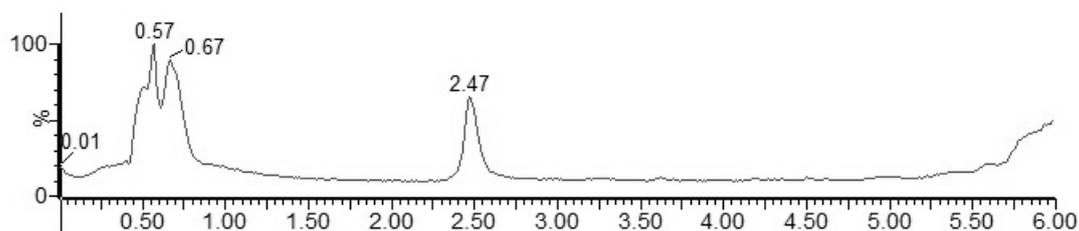


Abb.: Hydrolyse Peptid Pv durch pbp5: Es lassen sich keine Spaltprodukte finden. Hydrolysebedingungen: 0,1 M NaHPO₄; 100 μM Peptid; 1 μM Enzym pH 8, 30 °C 550 rpm. Messbedingungen:UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).

Peptid Pv



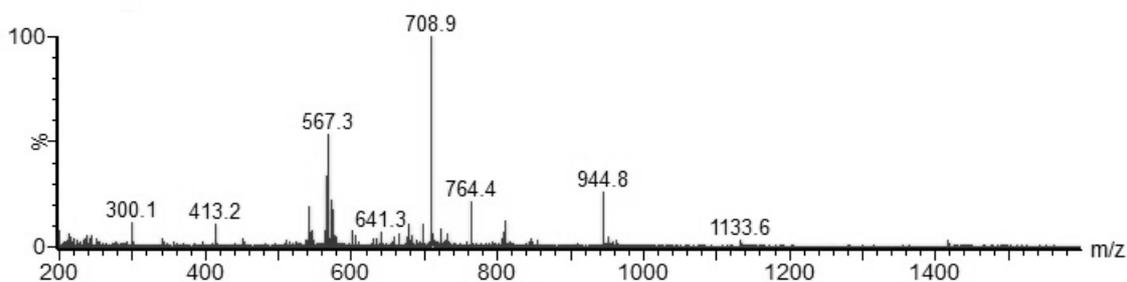


Abb.: Hydrolyse Peptid Pv durch DHy1: Es lassen sich Spaltprodukte bei 567,3 m/z finden. Hydrolysebedingungen: 0,1 M NaHPO₄; 100 μM Peptid; 1 μM Enzym pH 8, 30 °C 550 rpm. Messbedingungen:UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).

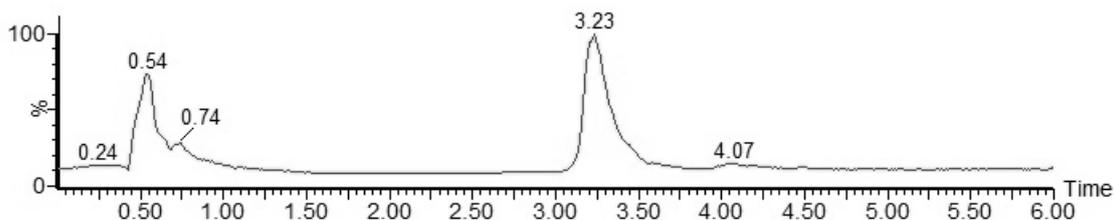
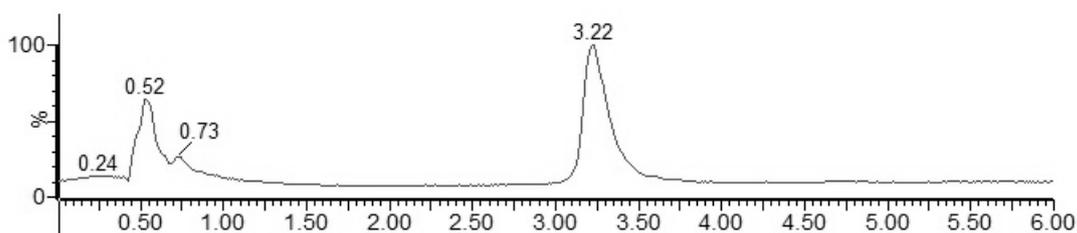


Abb.: Hydrolyse Peptid Pv durch DHy2: Es lassen sich keine Spaltprodukte finden. Hydrolysebedingungen: 0,1 M NaHPO₄; 100 μM Peptid; 1 μM Enzym pH 8, 30 °C 550 rpm. Messbedingungen:UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).

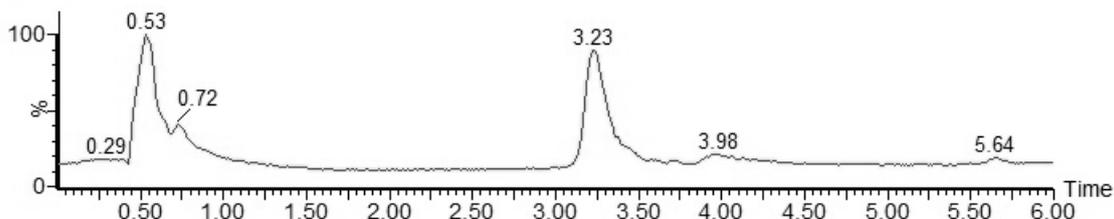
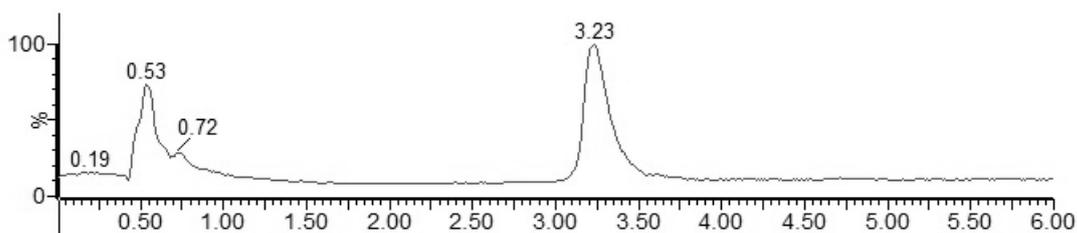


Abb.: Hydrolyse Peptid Pv durch DHy3: Es lassen sich keine Spaltprodukte finden. Hydrolysebedingungen: 0,1 M NaHPO₄; 100 μM Peptid; 1 μM Enzym pH 8, 30 °C 550 rpm. Messbedingungen:UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).

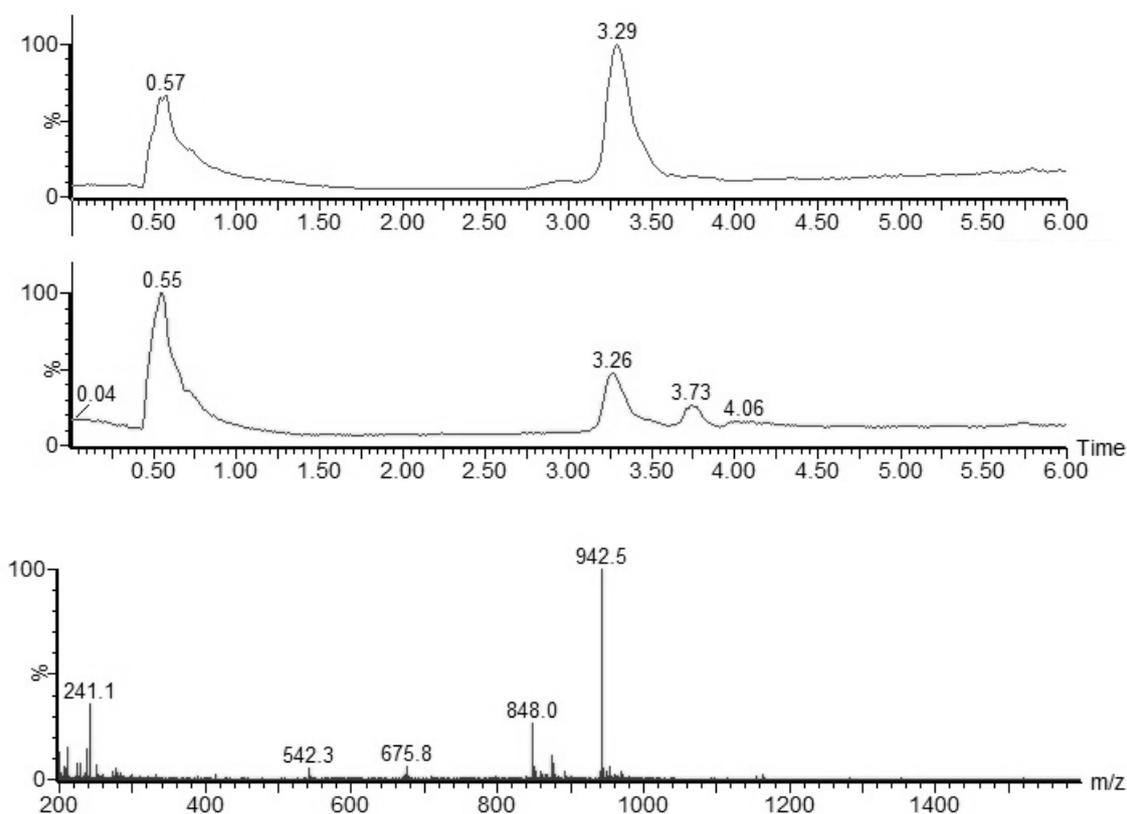


Abb.: Hydrolyse Peptid Pv durch DHy4: Es lassen sich Spaltprodukte bei 848,0 m/z finden. Hydrolysebedingungen: 0,1 M NaHPO₄; 100 μM Peptid; 1 μM Enzym pH 8, 30 °C 550 rpm. Messbedingungen:UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).

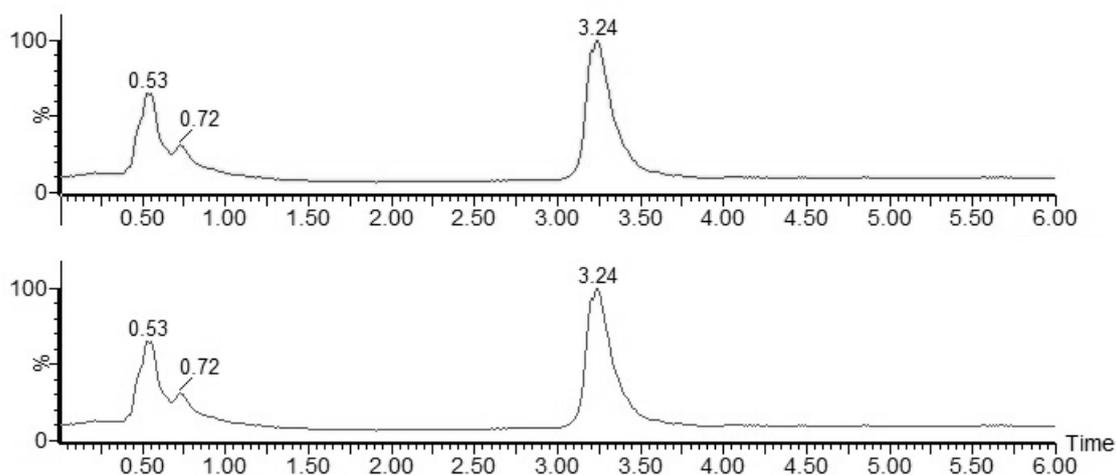


Abb.: Hydrolyse Peptid Pv durch pbp5: Es lassen sich keine Spaltprodukte finden. Hydrolysebedingungen: 0,1 M NaHPO₄; 100 μM Peptid; 1 μM Enzym pH 8, 30 °C 550 rpm. Messbedingungen:UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).

B5: Vergleich der Konzentrationen des Parvulins gegenüber einem definierten Volumen an Thioester auf einer SDS-Page

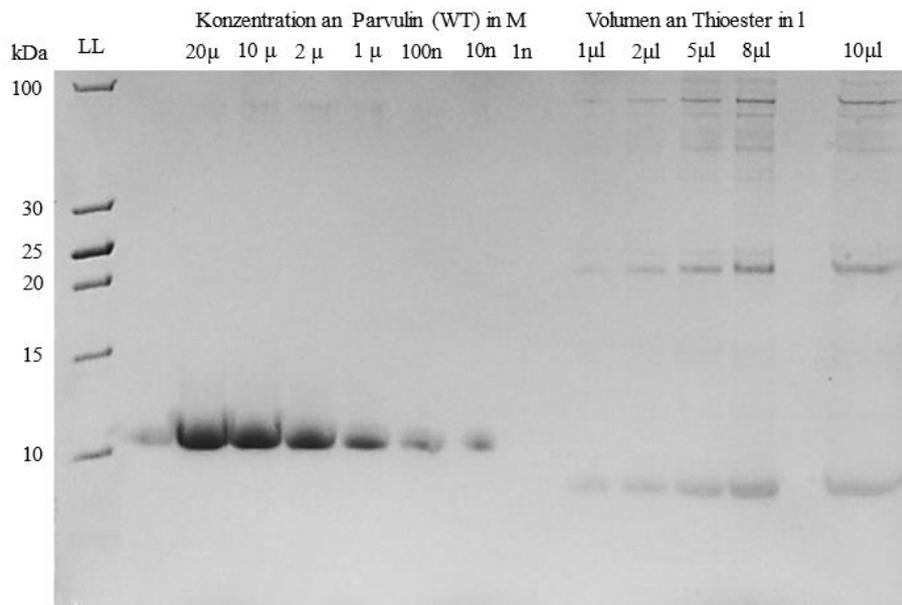


Abb.: Konzentrationsvergleich Parvulin mit Volumen an Thioester. Das Elektropherogramm (Tris/Tricine SDS-Page gefärbt mit Coomassie) zeigt Vergleiche von Parvulinkonzentrationen gegenüber Thioestervolumen. μ/n = Konzentration an Parvulin in μM bzw. nM ; μl = Volumen an eingesetzten Thioester.

B6: Ligationen mit chaotropen Salzen: NCL/Gua/Urea

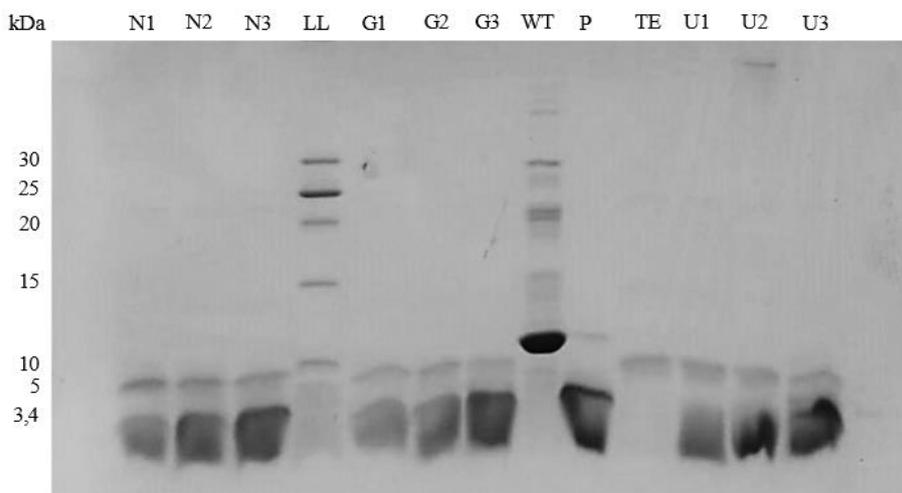


Abb.: Ligation Parvulin 10 mit verschiedenen chaotropen Salzen. Das Elektropherogramm (SDS-Page gefärbt mit Coomassie) zeigt die Ligation der Par10 Fragmente mit je 3 verschiedenen Puffern und Peptidkonzentrationen an. Low Ladder (LL): Page Ruler™ – Unstained Low Range Protein Ladder. (WT): Wildtyp Parvulin 10. (P): Peptid Pf. (N1-3): 1-3 mM Peptid Pf mit NCL-Puffer. (G1-3): 1-3 mM Peptid Pf in Gua (6M). (U1-3): 1-3 mM Peptid 3 in Urea (10M).

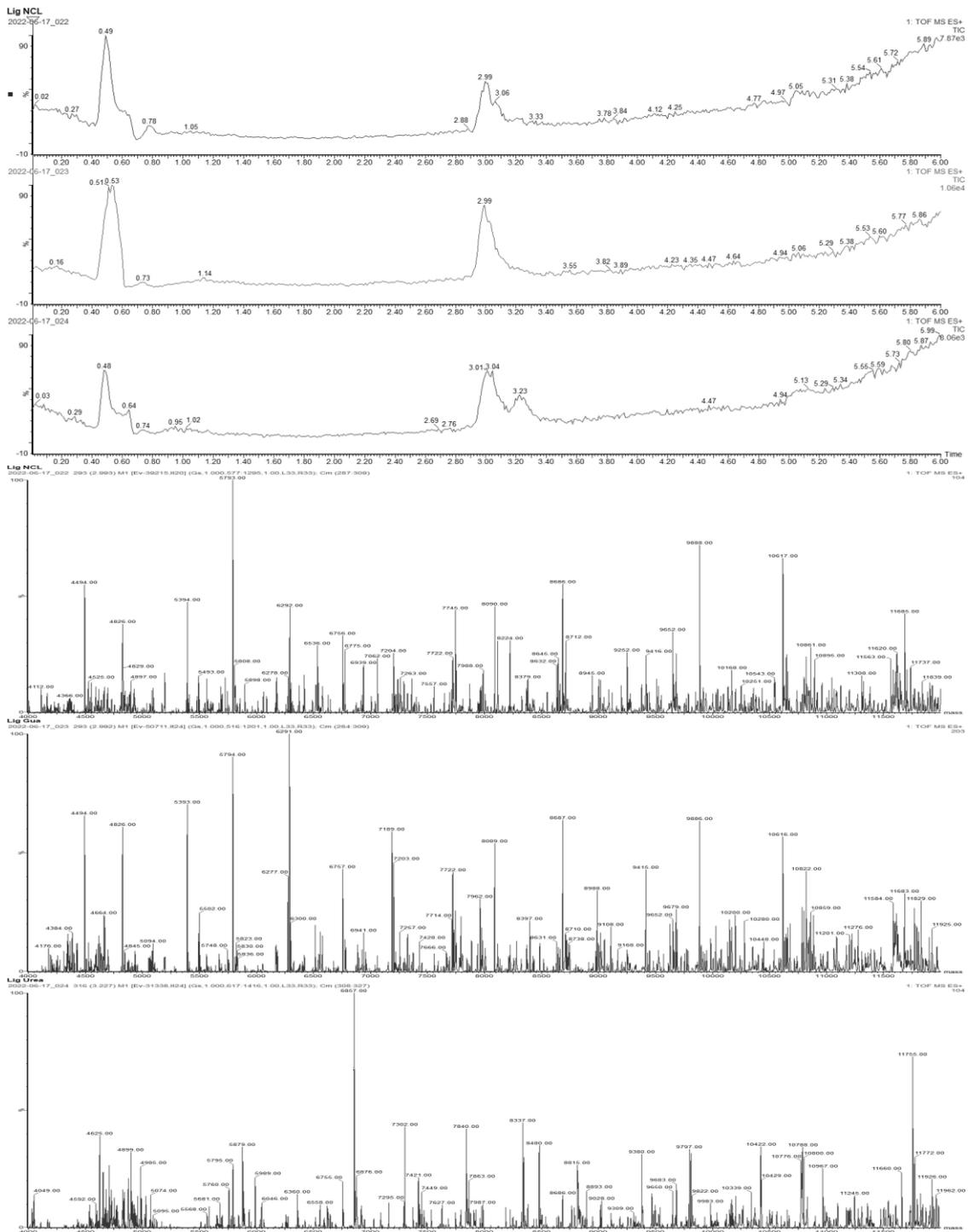


Abb.: Chromatogramme der Ligationen mit chaotropen Salzen im Vergleich

Abgebildet sind die Chromatogramme und Massenspektren der Ligationsversuche mit verschiedenen chaotropen Salzen. Das erste Chromatogramm und Massenspektrum (von oben) zeigen die Analytik der Ligation mit NCL-Puffer. Das zweite Chromatogramm und Massenspektrum (von oben) zeigen die Analytik der Ligation mit Guanidin (6 M). Das dritte Chromatogramm und Massenspektrum (von oben) zeigen die Analytik der Ligation mit Urea (10 M). Messbedingungen: UPLC-MS (siehe 3.6) (Software: MassLynx 4.1). Laufmittelsystem: ACN/ddH₂O (0,05 % FA); (Gradient: 5-100 in 5 min).

B7: Trennung der Ligation aufgrund von Molekularvolumen mit Hilfe von Amicon^R-Filtereinheiten

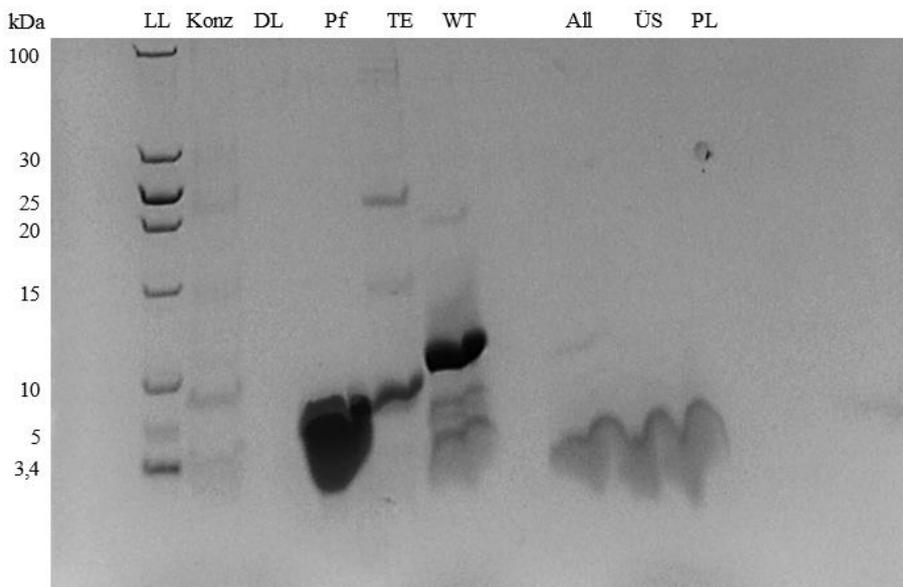


Abb.: SDS-Gel NCL nach Trennung mittels Amicon^R-Filtration

Das Elektropherogramm (Tris/Tricine SDS-Page gefärbt mit Coomassie) zeigt die Ligation der Par10 Fragmente und nachfolgender Filtration. Low Ladder (LL): Page RulerTM – Unstained Low Range Protein Ladder. Konz – Aufkonzentrierte Lösung; DL – Durchlauf; All- gesamter NCL-Ansatz; ÜS – Überstand; PL - Pellet

B8: Trennung der Ligation aufgrund ihrer Hydrophoben Eigenschaften mittels HPLC

HPLC

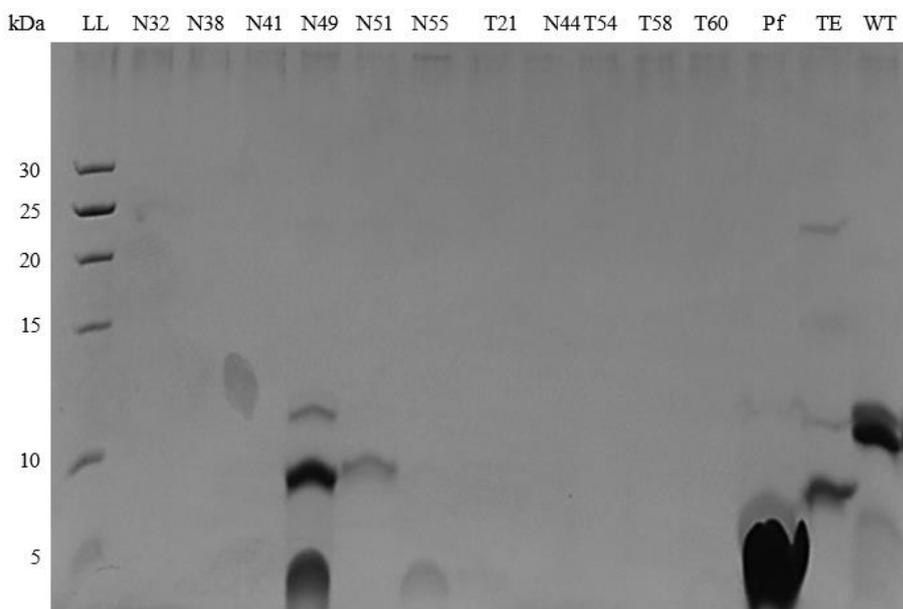


Abb.: SDS-Gel NCL nach HPLC (C18)

Das Elektropherogramm (Tris/Tricine SDS-Page gefärbt mit Coomassie) zeigt aufgefangene Signale nach der HPLC-Trennung (LL): Page RulerTM – Unstained Low Range Protein Ladder; N – Ansatz mit NCL-Puffer; T – Ansatz mit TFE als Lösungsmittel; [Zahl] - % ACN bei welchem der Peak erschien.

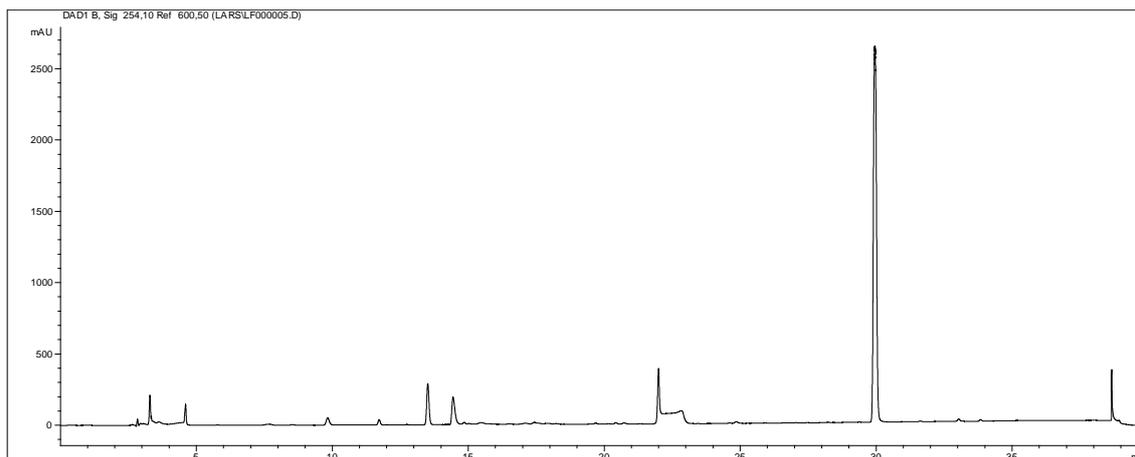


Abb. C18: Chromatogramm der hydrophoben Trennung per RP-HPLC mit C18-Säule

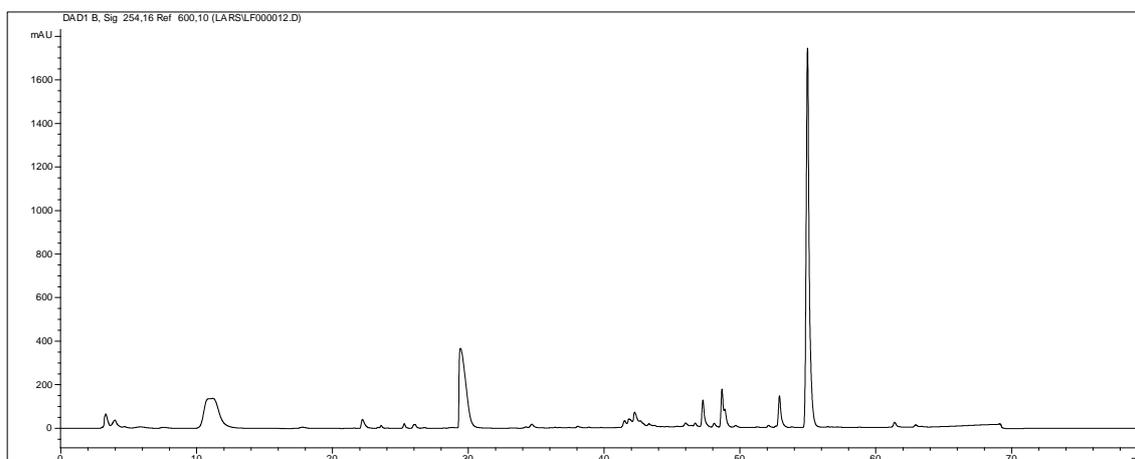


Abb. C8: Chromatogramm der hydrophoben Trennung per RP-HPLC mit C8-Säule

Anhang C

C1: Parvulin 10- Derivat (f81F) nach der Trennung der Ligation aufgrund ihrer polaren Wechselwirkungen durch einen Kationenaustauscher

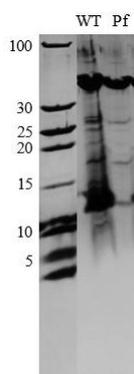


Abb.: SDS-Gel NCL nach Kationenaustauschchromatographie

Das Elektropherogramm (Tris/Tricine SDS-Page, Silberfärbung) zeigt das Parvulin-Derivat, nach der Reinigung mittels kationenaustauscher im Vergleich zum Parvulin- Wildtyp

Anhang D**D1: Firmenverzeichnis**

Iris Biotech GmbH	Marktredwitz, DE
Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, DE
SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH	St. Louis, US
Merck KGaA	Darmstadt, DE
LGC Standards GmbH	Teddington, UK
Th. Geyer GmbH + Co. KG	Renningen, DE
KMF Laborchemie Handels GmbH	Lohmar, DE
AppliChem GmbH	Darmstadt, DE
Acros Organics	Geel, BEL
SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, DE
NeoBiotech Co., Ltd.	Seoul, KOR
ThermoFisher Scientific	Waltham, US
New England Biolabs	Frankfurt (Main), DE
Sartorius Stedim Biotech GmbH	Göttingen, DE
Waters Corporation	Milford, US
Sys Tec Electronic AG	Heinsdorfergrund, DE
Eppendorf SE	Hamburg, DE
Uniequip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH	Planegg, DE
Infors AG	Bottmingen, CHE
Beckman Coulter Life Sciences	Brea, US
G. Heinemann Ultraschall und Labortechnik	Schwäbisch Gmünd, DE
LaboGene	Lillerød, DNK
Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH	Osterode am Harz, DE

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 30.01.2023



Ludwig Krauß