

Protein-Semisyntese und
mechanistische Studien zum Proteinspleißen
mit Hilfe eines gespaltenen Inteins

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der

Fakultät Chemie

der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Christina Ludwig

aus Lich

Dortmund 2008

Erstgutachter: Prof. Dr. Henning D. Mootz

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Engelhard

Tag der Abgabe:

Tag der Disputation:

*Entdecken ist Sehen, was jeder sieht,
und denken, was noch niemand gedacht hat.*

Albert Szent-Györgyi

ZUSAMMENFASSUNG

Als Intein wird eine interne Proteindomäne bezeichnet, die sich autoakatalytisch aus einem Vorläuferprotein herausschneiden kann und dabei die beiden flankierenden Domänen, das N- und C-Extein, mittels einer nativen Peptidbindung verknüpft. In einem gespaltenen Intein liegt die Inteindomäne in zwei Fragmente geteilt vor, welche zunächst assoziieren und rekonstituieren müssen, bevor das sogenannte *trans*-Proteinspleißen katalysiert wird. Aufgrund ihrer Spezifität und ihrer Toleranz gegenüber heterologen Exteinsequenzen stellen gespaltene Intein ein wichtiges biochemisches Werkzeug dar, mit dem z.B. Zielproteine aus zwei Polypeptidsequenzen aufgebaut werden können. Wird das Intein zur Ligation einer synthetischen und einer rekombinanten Polypeptidsequenz verwendet, dann entspricht das Spleißprodukt einem semisynthetischen Protein.

Der in dieser Arbeit etablierte neue Ansatz zur Protein-Semisynthese basiert auf dem künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Mini-Intein. Die Spaltung wurde in diesem Fall innerhalb einer variablen Schleifenregion nahe am N-Terminus vollzogen, wodurch ein synthetisch zugängliches N-terminales Inteinfragment (Int^{N}) und ein rekombinant exprimierbares C-terminales Segment (Int^{C}) entstanden, welche eine Größe von 11 und 143 Aminosäuren umfassen. Dieses neuartig gespaltene Intein ermöglicht die chemoenzymatische Synthese von N-terminal modifizierten semisynthetischen Proteinen.

Die Umsetzbarkeit der neuen Methode wurde anhand von zwei Modellproteinen getestet, wobei ein synthetisches Pentapeptid, inklusive einer 5,6-Carboxyfluoresceingruppe, mit dem N-Terminus des 12 kDa großen Proteins Thioredoxin und des 31 kDa großen Proteins β -Lactamase verknüpft wurde. Nach 24 h Inkubation bei 25°C, unter nativen Bedingungen und in einem mikromolaren Konzentrationsbereich beider Reaktanten, konnte eine maximale Spleißproduktausbeute von ca. 70% erreicht werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Reaktion auch in einem *E. coli* Zellysate selektiv ablief. Diese generelle Anwendbarkeit der Methode in komplexen Umgebung stellt zusammen mit der Tatsache, dass beim semisynthetischen *trans*-Proteinspleißen die Einführung von C-terminalen Thioestergruppen und N-terminalen Cysteinen nicht notwendig ist, den wichtigsten Vorteil im Vergleich zur *Expressed Protein Ligation* dar.

Für eine detaillierte Charakterisierung des semisynthetischen Inteins wurde die minimale Int^{N} -Sequenzlänge ermittelt. Messungen zur Inteinfragment-Affinität wurden durch die Bestimmung der Fluoreszenz-Anisotropie mit Hilfe einer Int^{C} -Mutante durchgeführt, deren Fähigkeit zur Spleißproduktbildung durch drei eingeführte Punktmutationen blockiert war. Die ermittelte Dissoziationskonstante betrug 1,1 μM , und die Geschwindigkeitskonstante der Inteinfragment-Assoziation entsprach einem Wert von 16,8 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Mit Hilfe eines systematischen Alanin-Scans der Int^{N} -Sequenz konnten drei für eine Assoziation essentielle hydrophobe Aminosäuren identifiziert werden (Ile2, Ile8 und Leu10), während Substitutionen an anderen Positionen toleriert wurden.

Schließlich konnten mit dem semisynthetischen Intein verschiedene mechanistische Studien durchgeführt werden. So offenbarte die Reaktion eines Gly[-1]Ala-substituierten Peptids die Bildung eines Thiazolinrings, ausgelöst durch eine anormale Dehydrierung des Oxythiazolidin-Anion-Intermediats. Diese Beobachtung stellt den ersten experimentellen Beweis für dieses bislang lediglich postulierte Intermediat des N \rightarrow S-Acyltransfers dar. Eine zweite interessante Nebenreaktion des Spleißmechanismus, die Bildung eines Caprolactons, konnte mittels einer N-methylierten Aminosäure an Position [-1] und eines Serins an Position [-2] induziert werden. Auch weitere unnatürliche Aminosäurebausteine wurden an interessanten Positionen innerhalb der Int^{N} - und der N-Exteinsequenz eingeführt und erlaubten eine Analyse der strukturellen Anforderungen der räumlich und zeitlich hoch koordiniert ablaufenden Reaktionsschritte des Proteinspleißens.

SUMMARY

The term intein is used for an internal protein domain, that catalyses its own excision out of a precursor protein and the concomitant linkage of the two flanking sequences, the N- and C-extein, with a native peptide bond. In split inteins, the intein domain is divided into two parts that undergo fragment association followed by protein splicing *in trans*. The specificity and sequence promiscuity of split inteins make them a generally useful biochemical tool, for example for the preparation of proteins out of two fragments. If the intein is used to ligate a synthetic and a recombinant fragment the splice product represents a semi-synthetic protein.

The new approach outlined in this work is based on the artificially split *Ssp* DnaB mini-intein. The splitting was performed at a variable loop position close to the N-terminus leading to a synthetically accessible N-terminal intein fragment (Int^N) and a recombinantly expressible C-terminal part (Int^C), which are 11 and 143 amino acids in length, respectively. This intein enables the chemo-enzymatic synthesis of N-terminally modified semi-synthetic proteins.

The feasibility of the new approach was shown experimentally using two model systems, wherein a synthetic N-extein peptide pentamer, including a 5,6-Carboxyfluorescein moiety, was ligated to the N-terminus of the 12 kD protein thioredoxin and the 31 kD protein β -lactamase. After 24 h of incubation at 25°C, under native conditions and using a peptide and protein concentration in the micromolar range, the desired splice product could be formed with a maximal yield of approximately 70%. Furthermore, the reaction also proceeded selectively in an *E. coli* cell lysate. The applicability in such complex mixtures together with the fact, that this intein enables the generation of N-terminally modified semi-synthetic proteins without a necessary incorporation of thioester groups and amino terminal cysteins, are the main advantages compared to *Expressed Protein Ligation*.

For a detailed characterisation of the semi-synthetic intein the minimal sequence requirements of Int^N were evaluated. Measurements of changes in fluorescence anisotropy were carried out to investigate the inherent affinity of both intein fragments. For that purpose an Int^C mutant blocked in protein splicing was used, leading to a dissociation constant of 1.1 μ M and a rate constant of complex formation of 16.8 M⁻¹s⁻¹. Furthermore, based on an alanine scanning analysis of the Int^N(1-11) sequence, three for the complex association essential hydrophobic residues could be identified (Ile2, Ile8 and Leu10), whereas substitutions at other positions were tolerated.

Additionally, the semi-synthetic intein was well suited for further mechanistic studies of the protein splicing mechanism. Intriguingly, a Gly[-1]Ala-substitution of the first amino acid within the N-extein, was revealed to result in thiazoline ring formation involving the catalytic Cys1, likely by aberrant dehydration of an oxythiazolidine-anion intermediate. This finding provides the first experimental evidence for this postulated intermediate during the initial N,S \rightarrow acyl shift. A second interesting side reaction within the splicing mechanism, the formation of a caprolactone, could be induced using an N-methylated amino acid at position [-1] and a serin residue at position [-2]. Further unnatural amino acids were successfully introduced at delicate positions within the synthetic Int^N-fragment as well as the N-extein sequence, and their impact on the spatially and temporally coordinated steps of the splicing mechanism was evaluated.

Der Hauptteil der vorliegenden Arbeit wurde bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Christina Ludwig, Martina Pfeiff, Uwe Linne und Henning D. Mootz (2006)

“Ligation of a Synthetic Peptide to the N Terminus of a Recombinant Protein Using Semisynthetic Protein trans-Splicing”

Angewandte Chemie International Edition, **45**, 5218 -5221

Angewandte Chemie, **118**, 5343 - 5347

Christina Ludwig, Dirk Schwarzer und Henning D. Mootz (2008)

“Interaction Studies and Alanine Scanning Analysis of a Semi-synthetic Split Intein Reveal Thiazoline Ring Formation from an Intermediate of the Protein Splicing Reaction”

Journal of Biological Chemistry, **283**, 25264 - 25272

Weitere Publikationen:

H.D. Mootz, T. Kurpiers, C. Ludwig, S. Brenzel (2006)

“Method for the production of a chemically modified protein”

“Verfahren zur Herstellung eines chemisch modifizierten Proteins“

Patent Antrag; Pub. Nr.: WO/2007/076974; Int. Appl. Nr.: PCT/EP2006/012434

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	2
1 ABKÜRZUNGEN	8
2 EINLEITUNG	12
2.1 Inteine	13
2.1.1 Mechanismus des Proteinspleißens.....	16
2.1.1.1 Der N→O- und N→S-Acyltransfer.....	18
2.1.1.2 Die intramolekulare Umesterung.....	19
2.1.1.3 Die Asparaginzyklisierung.....	20
2.1.1.4 Der S→N- und O→N-Acyltransfer.....	20
2.1.2 Gespaltene Inteine und <i>trans</i> -Proteinspleißens.....	21
2.1.3 Das <i>Ssp</i> DnaB-Intein.....	22
2.2 Protein-Semisynthese	24
2.2.1 Codon-basierter Einbau unnatürlicher Aminosäuren.....	28
2.2.2 Allgemeine Protein-Semisynthese.....	29
2.2.2.1 Biokonjugation über die natürlichen Aminosäureseitenketten.....	29
2.2.2.2 Bioorthogonale chemische Konjugationsmethoden.....	31
2.2.2.3 Chemoenzymatische Modifikationen von Fusionsproteinen.....	33
2.2.2.4 Chemoselektive Modifikationen durch Chelatoren.....	35
2.2.3 Rückgrat- und rekonstituierende Protein-Semisynthese.....	36
2.2.3.1 Die spurlose Staudinger Ligation.....	36
2.2.3.2 Expressed Protein Ligation.....	37
2.2.3.3 Die reverse Proteolyse.....	40
2.2.3.4 Die Sortase-vermittelte Ligation.....	41
2.2.3.5 Das semisynthetische <i>trans</i> -Proteinspleißens.....	42
2.3 Aufgabenstellung	43
3 MATERIALIEN	45
3.1 Geräte	45
3.2 Enzyme und Chemikalien	46
3.3 Vektoren	47
3.3.1 pSU38.....	47
3.3.2 pMAL-c2X.....	47
3.3.3 pQE60.....	47
3.3.4 pET16b.....	47
3.3.5 pET22b.....	48
3.3.6 pET28a.....	48
3.4 Mikroorganismen	48

3.5	Medien	49
3.6	Puffer und Lösungen	49
4	METHODEN	52
4.1	Molekularbiologische Techniken	52
4.1.1	Konstruktion der Expressionsplasmide.....	52
4.2	Protein-Techniken	56
4.2.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	56
4.2.2	Zellaufschluss.....	57
4.2.3	Chromatographische Proteinreinigung.....	57
4.2.3.1	Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie.....	57
4.2.3.2	Anionenaustauschchromatographie.....	60
4.2.4	Koexpression in <i>E. coli</i>	61
4.3	Peptidchemie	61
4.3.1	Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie.....	61
4.3.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Fmoc-basierten Festphasenpeptidsynthese.....	62
4.3.3	Seitenkettenentschützung und Harzabspaltung.....	64
4.3.4	Peptidreinigung mittels präparativer HPLC.....	64
4.3.5	Photometrische Bestimmung der Peptidkonzentration.....	65
4.4	Biochemische Methoden	65
4.4.1	SDS-PAGE Analyse der Spleißreaktion.....	65
4.4.2	SDS-PAGE und native PAGE der Komplexbildungsreaktionen.....	66
4.4.3	Präparative Protein-Semisynthese.....	67
4.4.3.1	Herstellung eines N-terminal modifizierten Thioredoxins.....	67
4.4.3.2	Herstellung einer N-terminal modifizierten β -Lactamase.....	67
4.4.4	Der enzymatische Thioredoxin-Assay.....	68
4.4.5	Der enzymatische β -Lactamase-Assay.....	68
4.4.6	Proteinmodifikation im <i>E. coli</i> Zellextrakt.....	69
4.4.7	Modifikationsreaktionen der Cysteinseitenkette.....	69
4.4.8	Reaktionen in ^{18}O -isotopenmarkiertem Wasser.....	70
4.5	Kinetische Methoden	71
4.5.1	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Spleißreaktion.....	71
4.5.2	Bestimmung der kinetischen Parameter der Inteinfragment-Assoziation.....	74
4.5.2.1	Theoretischer Hintergrund zur Fluoreszenz-Anisotropie.....	74
4.5.2.2	Theoretischer Hintergrund zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d	75
4.5.2.3	Experimentelle Durchführung der Messungen zur Fluoreszenz-Anisotropie.....	77
4.5.2.4	Quantenausbeute des Fluorophors in gebundener und freier Form.....	78
4.6	Analytische Methoden	79
4.6.1	Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	79
4.6.2	MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	80
4.6.2.1	Tryptischer Verdau von Proteinbanden.....	80
4.6.3	ESI Massenspektrometrie.....	81
4.6.3.1	ESI-MS/MS und ESI-MS ³	81

5	ERGEBNISSE	82
5.1	Teil 1: Etablierung einer neuen semisynthetischen Methode zur N-terminalen Modifikation von Proteinen	83
5.1.1	Vorversuche mit einem rekombinanten System.....	83
5.1.2	Etablierung des semisynthetischen Systems	84
5.1.3	Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	86
5.1.4	Mechanistische Kontrollreaktionen durch Punktmutationen spleiß-essentieller Aminosäuren	89
5.1.5	Präparative Darstellung verschiedener N-terminal modifizierter Zielproteine.....	92
5.1.5.1	Semisynthetische Darstellung von Thioredoxin	92
5.1.5.2	Semisynthetische Darstellung der β -Lactamase	93
5.1.6	Weitere Beispiele verschiedener Zielproteine.....	94
5.1.7	Untersuchungen zur C-terminalen Spaltung <i>in vivo</i>	96
5.1.8	Semisynthetisches <i>trans</i> -Proteinspleißen im <i>E. coli</i> -Zellextrakt	97
5.2	Teil 2: Optimierung und Charakterisierung des semisynthetischen <i>Ssp</i> DnaB-Inteins	99
5.2.1	Variation der Int ^C -Sequenzlänge.....	99
5.2.2	Evaluierung der minimalen Int ^N -Sequenz.....	101
5.2.3	Kinetische Charakterisierung der Spleißreaktion.....	105
5.2.4	Der Alanin-Scan: Identifizierung essentieller Aminosäuren zur Int ^N /Int ^C -Wechselwirkung.....	106
5.2.5	Untersuchungen zum Einfluss elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen Int ^N und Int ^C	111
5.3	Teil 3: Mechanistische Studien am semisynthetischen Intein	113
5.3.1	Identifikation eines Thiazolinrings als Nebenprodukt des Proteinspleißens	113
5.3.2	Untersuchungen zur Thiazolinbildung im Endonuklease-gespaltenen <i>Ssp</i> DnaB-Intein	117
5.3.3	Evaluierung des Einflusses einer zusätzlichen Methylgruppe an Position [-1] auf Spleißen und Thiazolinbildung	119
5.3.4	Identifikation eines Lactonrings als Nebenprodukt im Proteinspleißen	122
5.3.5	Mechanistische Untersuchungen in ¹⁸ O-isotopenmarkiertem Wasser.....	124
5.3.6	Mechanistische Studien zur Cys1-Position mittels unnatürlicher Aminosäurebausteine	126
6	DISKUSSION	130
6.1	Etablierung eines neuen gespaltenen Inteins zur Protein-Semisynthese	130
6.1.1	Semisynthetische gesplattene Inteine.....	130
6.1.2	Gegenüberstellung von EPL und semisynthetischem <i>trans</i> -Proteinspleißen.....	135
6.1.2.1	Die flankierenden Aminosäuren der Ligationsstelle.....	136
6.1.2.2	Vorteile des semisynthetischen <i>trans</i> -Proteinspleißens	138
6.1.3	Löslichkeitseigenschaften des C-terminalen Inteinfragments.....	139
6.2	Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen den semisynthetischen Inteinfragmenten	140
6.2.1	Der „Alanin-Scan“ und Vergleiche mit Int ^N (1-11)-Sequenzen anderer Inteine	140
6.2.2	Reaktionskinetiken gesplattener Inteine.....	142

6.3	Identifikation neuer Nebenprodukte beim <i>trans</i>-Proteinspleißen	147
6.3.1	Thiazolinringbildung	147
6.3.2	Lactonringbildung	150
6.4	Die Proteinfragment-Komplementation	151
6.5	Ausblick	154
7	LITERATUR	158
8	ANHANG	165
9	DANKSAGUNG	172

1 Abkürzungen

ACP	Acyl-Carrierprotein
Amp ¹⁰⁰	Ampicillin 100 µg/mL
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCCP	Biotin-Carboxyl-Carrierprotein
ber.	berechnet
<i>bla</i>	β-Lactam-Antibiotika (Ampicillin-Resistenz)
Boc	<i>t</i> -Butoxycarbonyl
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CHCA	4-Hydroxy- <i>α</i> -Cyanozimtsäure (<i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>)
CHO	Zellen aus den Eierstöcken chinesischer Hamster (<i>chinese hamster ovary cells</i>)
Da	Dalton
dd H ₂ O	doppelt destiliertes Wasser / reinst Wasser
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMF	Dimethylformamid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPL	<i>Expressed Protein Ligation</i>
eq.	Äquivalent (<i>equivalent</i>)
ESI	Elektronenspray-Ionisation
EtOH	Ethanol
EtSH	Ethanthiol
Ex ^C	C-Extein
Ex ^N	N-Extein
FGE	Formylglycin-generierendes Enzym
FKBP12	FK506 bindendes Protein
Fl	5,6-Carboxyfluorescein
FLAG-Tag	Octapeptidsequenz (NH ₂ -DYKDDDDK-COOH)
FlAsH	Fluorescein-derivatisierte Biarsenverbindung (<i>fluorescein arsenical helix binder</i>)
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FPLC	schnelle Flüssigchromatographie (<i>fast performance liquid chromatography</i>)
FRB	FKBP-Rapamycin-bindene Domäne
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
gem.	gemessen
gpD	Kopfprotein des λ-Bakteriophagen
h	Stunden (<i>hours</i>)
hAGT	humane O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase
HBTU	2-(H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HEK	menschliche embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney cells</i>)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure)
His ₆	Hexahistidin-Tag
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HPr	Histidin-enthaltendes Protein

Int ^C	C-terminales Inteinfragment
Int ^N	N-terminales Inteinfragment
IPL	<i>Intein-Mediated Chemical Ligation</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
Kan ⁵⁰	Kanamycin (50 µg/mL)
kbp	Kilobasenpaare
L	Liter
LB-Medium	Luri-Bertani Medium
M	Mol pro Liter
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
MCS	multipler Klonierungsbereich (<i>multiple cloning site</i>)
MESNA	Mercaptoethansulfonsäure Natriumsalz
min	Minuten
<i>Mja</i>	<i>Methanococcus jannaschii</i> (Archaeobakterium)
mRFP	monomeres rot-fluoreszierendes Protein
MS	Massenspektrometrie
<i>Mth</i>	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> (Archaeobakterium)
<i>Mtu</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Eubakterium)
MWCO:	Ausschlussmolekulargewicht (<i>molecular weight cut off</i>)
<i>Mxe</i>	<i>Mycobacterium xenopi</i> (Eubakterium)
n.d.	nicht detektierbar
NEM	N-Ethylmaleinimid
n.g.	nicht gemessen
NHS-Ester	N-Hydroxysuccinimid-Ester
NRPS	nicht-ribosomale Peptidsynthetase
NTA	Nitriloacetat
OD	optische Dichte
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCA	Proteinfragment-Komplementation
PCP	Peptidyl-Carrierprotein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PFC	Proteinfragment-Komplementation
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i> (Archaeobakterium)
PKA	Proteinkinase A
PrP	Prionprotein
<i>Psp</i>	<i>Pyrococcus species</i> GB-D (Archaeobakterium)
PTD	Protein-Transduktionsdomäne
ReAsH	Resorufin-derivatisierte Biarsenverbindung
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SA	Sinapinsäure (<i>sinapic acid</i>)
<i>Sc</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Hefe)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SLF	synthetischer Ligand für FKBP12
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (<i>solid-phase peptide synthesis</i>)
<i>Ssp</i>	<i>Synechocystis species</i> Stamm PCC6803 (Cyanobakterium)
Strep	Strep-Tag II (Signalsequenz: NH ₂ -WSHPQFEK-COOH)

TCEP	Triscarboxyethylphosphin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
TMD	Transmembran-Domäne
TMP	Trimethoprim
TOF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

Tabelle 1. Die proteinogenen Aminosäuren - Abkürzungen und Molekulargewichte

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode	MW [g/mol]
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamat	Glu	E	147
Glutamin	Gln	Q	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

Tabelle 2. Die genetische Codierung der Aminosäuren

(5'-Ende)	U	C	A	G	(3'-Ende)
U	Phe (21,8)	Ser (9,2)	Tyr (16,4)	Cys (5,1)	U
U	Phe (16,6)	Ser (8,9)	Tyr (12,3)	Cys (6,4)	C
U	Leu (13,6)	Ser (7,7)	Term (2,0)	Term (1,0)	A
U	Leu (13,2)	Ser (8,7)	Term (0,3)	Trp (14,4)	G
C	Leu (11,2)	Pro (7,1)	His (12,6)	Arg (20,9)	U
C	Leu (10,6)	Pro (5,3)	His (9,7)	Arg (21,4)	C
C	Leu (3,9)	Pro (8,5)	Gln (14,6)	Arg (3,6)	A
C	Leu (51,5)	Pro (22,6)	Gln (29,0)	Arg (5,6)	G
A	Ile (29,7)	Thr (9,5)	Asn (18,3)	Ser (9,0)	U
A	Ile (24,9)	Thr (22,9)	Asn (21,8)	Ser (15,6)	C
A	Ile (5,1)	Thr (7,7)	Lys (34,4)	Arg (2,6)	A
A	Met (27,3)	Thr (14,0)	Lys (11,3)	Arg (1,6)	G
G	Val (19,0)	Ala (16,1)	Asp (32,2)	Gly (25,3)	U
G	Val (14,9)	Ala (25,1)	Asp (19,5)	Gly (28,9)	C
G	Val (11,2)	Ala (20,5)	Glu (39,8)	Gly (8,4)	A
G	Val (25,7)	Ala (32,6)	Glu (18,5)	Gly (11,1)	G

2 EINLEITUNG

Im sogenannten „postgenomen Zeitalter“, d.h. ab dem Zeitpunkt der Entschlüsselung des menschlichen Genoms, liegt eine der größten Herausforderungen in der Untersuchung und Aufklärung von Proteinstrukturen und -funktionen, sowie im Verständnis des komplexen räumlichen und zeitlichen Zusammenspiels der Proteine innerhalb einer lebenden Zelle. Um verschiedenste biochemische Fragestellungen zu einem Protein von Interesse zu beantworten, muss dieses Protein in den allermeisten Fällen in irgendeiner Form selektiv modifiziert bzw. mit einer biophysikalischen Sonde versehen werden. Die Entwicklung molekularbiologischer Techniken zur präzisen Manipulation von DNA, und die damit einhergehende rekombinante Genexpression, ermöglichten die Fusionierung eines Zielproteins mit genetisch codierten Sequenzen wie z.B. dem Hexahistidin-Tag (His₆), dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) oder verschiedenen Epitop-Tags, wodurch Einblicke in Bereiche eines Proteins wie Struktur, Funktion, Lokalisation, Dynamik oder Interaktion mit anderen Partnern möglich wurden. Der Einbau unnatürlicher Strukturen und Funktionen in Proteine wurde erst mit der Etablierung chemisch-basierter Techniken realisierbar. Hierzu zählen z.B. die klassischen Biokonjugationsmethoden [1], der Codon-basierte Einbau unnatürlicher Aminosäuren [2], die Totalsynthese von Proteinen [3] oder die Protein-Semisynthese [4, 5]. Mit Hilfe der Protein-Semisynthese, bei der das Zielprotein aus einem nativ oder rekombinant generierten Proteinsegment und einer synthetischen Komponente zusammengesetzt wird, können gleich mehrere Modifikationen unterschiedlichster Art selektiv in nahezu beliebig große Proteine eingeführt werden.

Eine ganz besondere Rolle bei gleich zwei verschiedenen Techniken zur Protein-Semisynthese spielt die im Zentrum dieser Arbeit stehende Proteinklasse der Inteine. Seit ihrer Entdeckung Anfang der 90er Jahre [6, 7] ist auf diesem Gebiet intensive Forschung betrieben worden. So konnten mittlerweile die einzelnen Schritte der Intein-katalysierten Proteinspleißreaktion eindeutig identifiziert werden [8-11]. Als biochemische Werkzeuge zur Expression, Modifikation, Ligation, Zyklisierung oder Immobilisierung von Proteinen werden Inteine mittlerweile in einem sehr breiten Anwendungsfeld eingesetzt (für Übersichtsartikel siehe [12, 13]). Jedes Jahr verlängert sich die Liste der bekannten Inteine aus den verschiedensten Organismen. Trotz der in den letzten zwei Jahrzehnten intensiv betriebenen Intein-Forschung konnten einige essentielle Fragen bislang nicht eindeutig geklärt werden, welche z.B. die native Funktion der Inteine, ihren evolutionären Ursprung oder den detaillierten Mechanismus einzelner Reaktionsschritte im Proteinspleißen betreffen. Daher

bleibt die strukturelle und mechanistische Untersuchung von Inteinen bis heute ein spannendes Forschungsgebiet, um dieses wichtige und weit verbreitete biochemische Werkzeug besser zu verstehen und weiterzuentwickeln.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine solche Entwicklung realisiert werden, indem ein an Position 11 künstlich gespaltenes Intein etabliert wurde. Durch den vollsynthetischen Zugang des N-terminalen Inteinfragments (Int^{N}) konnte dieses System erfolgreich zur N-terminalen Modifikation verschiedener Zielproteinen eingesetzt werden. Weiterhin gelangen mit diesem semisynthetischen Ansatz verschiedene mechanistische Untersuchungen, wodurch neue zyklische Nebenprodukte identifiziert und der Einfluss unnatürlicher Aminosäuren auf die einzelnen Schritte im *trans*-Proteinspleißen charakterisiert werden konnten.

2.1 Inteine

Als Intein wird eine interne Proteindomäne bezeichnet, welche die Eigenschaft besitzt, sich posttranslational und autokatalytisch aus einem Vorläuferprotein herauszuschneiden (Abbildung 1).

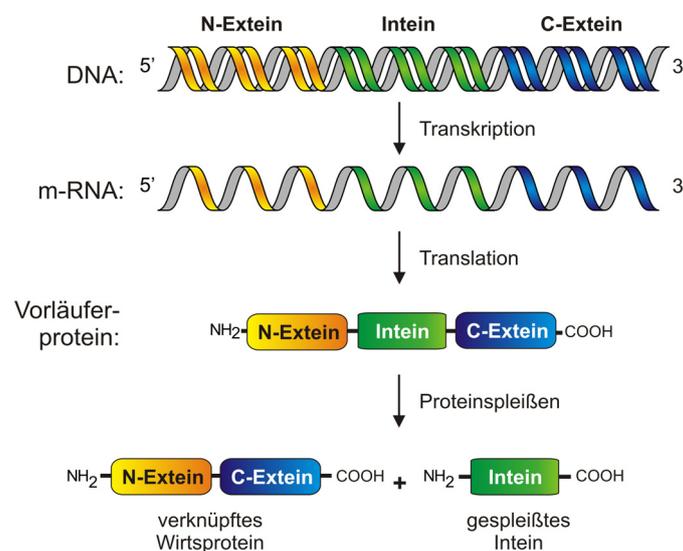


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Proteinspleißens. Anders als beim m-RNA-Spleißen erfolgt die Intein-vermittelte Spleißreaktion erst auf Proteinebene, d.h. nach Transkription der DNA in m-RNA und Translation zum Vorläuferprotein. Aus diesem Vorläuferprotein schneidet sich das Intein autokatalytisch heraus und ligiert gleichzeitig beide flankierenden Exteine über eine native Peptidbindung.

Die beiden flankierenden Proteinsegmente, die sogenannten N- bzw. C-Exteine, werden dabei kovalent über eine native Peptidbindung miteinander verknüpft [14, 15]. Bei dieser in Analogie zum m-RNA-Spleißen als „Proteinspleißen“ bezeichneten Reaktion, ist das Intein auf keinerlei zusätzliche Energiequellen in Form von ATP oder anderen Cofaktoren

angewiesen, sondern alle für das Spleißen essentiellen Informationen sind in der Primärstruktur und der daraus resultierenden Sekundär- und Tertiärstruktur des Inteins zusammen mit der N-terminalen Aminosäure des C-Exteins enthalten.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden bereits über 300 verschiedene Inteine anhand von Sequenzhomologien in Einzellern aus allen drei Domänen des zellulären Lebens (Archaeen, Bakterien und Eukaryoten), sowie in Viren und Phagen gefunden. Eine ständig aktualisierte Übersicht befindet sich in der Intein-Datenbank unter <http://www.neb.com/neb/inteins.html>. Die phylogenetische Verteilung der Inteine ist sehr unregelmäßig. So konnte für jedes Intein-enthaltende Gen ein Intein-freies Allel in einer nahen verwandten Spezies identifiziert werden, was eine essentielle regulatorische Funktion der Inteine fragwürdig erscheinen lässt. Ein wichtiges Charakteristikum vieler Inteine ist ihre Insertionsposition in hoch konservierten Bereichen oder aktiven Zentren essentieller Wirtsproteine [10]. Außerdem enthalten 80% aller Inteine innerhalb des eigenen Gens einen weiteren kodierenden Bereich für eine sogenannte „Homing Endonuklease“ inseriert. Inteine mit solch einer Insertion sind üblicher Weise ca. 300 bis 600 Aminosäuren groß und werden als „Maxi-Inteine“ bezeichnet (siehe Abbildung 2). Die sogenannten „Mini-Inteine“ enthalten keine Endonuklease und sind lediglich aus 134 (*Mth* RIR1, kleinstes bekanntes Intein) bis ca. 200 Aminosäuren aufgebaut. Mini-Inteine kommen in der Natur vor, können aber auch durch die Deletion des Genabschnitts der Endonukleasedomäne künstlich erzeugt werden, da letztgenannte für die Funktion der Spleißreaktion keinerlei Bedeutung hat [16-19]. Allerdings verschafft die Endonuklease den Maxi-Inteinen eine gewisse Genmobilität durch horizontalen Gentransfer [20], wodurch die unregelmäßige phylogenetische Verteilung der Inteine erklärt werden könnte. Häufig gibt es deutliche Unterschiede im Codon-Gebrauch und im GC-Gehalt der Inteine im Vergleich zu den jeweiligen Exteinsequenzen, was darauf schließen lässt, dass einige Inteingene in jüngerer Zeit zwischen den Organismen ausgetauscht worden sind [20, 21]. Aber trotz vielerlei Theorien kann die Frage nach dem Ursprung und der nativen Funktion der Inteine und ihrer Beziehung mit der Endonuklease bis heute nicht eindeutig beantwortet werden.

Anhand von Sequenzhomologien und durch zusätzliche Mutationsstudien konnten insgesamt 10 konservierte Sequenzmotive einer Inteindomäne bestimmt werden, die auch zur Identifikation neuer Inteine dienen (siehe Abbildung 2). Die Motive A, N2, B, N4, F und G stellen die für das Proteinspleißen essentiellen Bereiche dar, während die Motive C, D, E und H die Endonuklease-Aktivität ausmachen [22-24]. Kein Aminosäurerest ist in allen Inteinen zu 100% konserviert, aber häufig besitzen Inteine an ihren am höchsten konservierten Positionen verwandte Aminosäuren. So enthalten die meisten bekannten Inteine eine

Aminosäure mit nukleophiler Seitenkette (Cystein oder Serin) am N-Terminus, und auch das C-Extein beginnt mit einer nukleophilen Aminosäure (Cystein, Serin oder Threonin). Einige wenige Inteine mit einer Alaninfunktion am N-Terminus stellen eine Ausnahme dar. Weiterhin enden alle Inteine mit Asparagin oder der verwandten Aminosäure Glutamin. Das Motiv B enthält die konservierte Sequenz Thr-X-X-His. Ein zweiter hochkonservierter Histidinrest befindet sich direkt vor dem C-terminalen Asparagin im Motiv G.

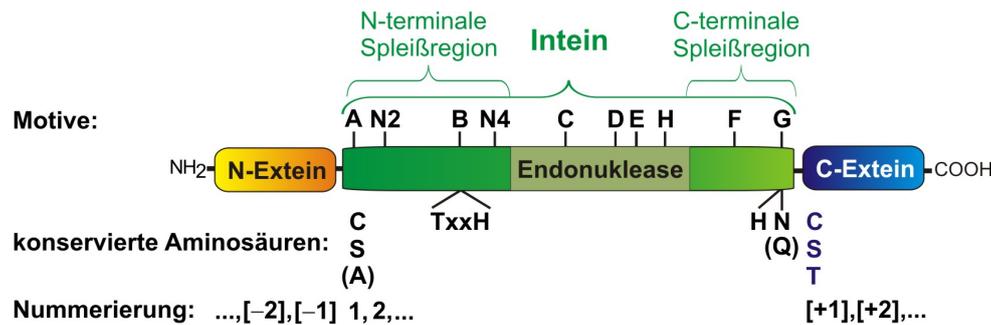


Abbildung 2. Darstellung der konservierten Sequenzmotive und Aminosäuren in einem Maxi-Intein. Die für das Proteinspleißen konservierten Sequenzmotive A, N2, B, N4, F und G sind in Maxi- wie Mini-Inteinen enthalten. Die Blöcke C, D, E und H dagegen liegen innerhalb der nur in Maxi-Inteinen insertierten Endonukleasedomäne. Bei Mini-Inteinen ist diese Domäne durch eine kurze Linkersequenz ersetzt. Selten vorkommende konservierte Aminosäuren sind in Klammern dargestellt.

Die Nummerierung der Aminosäuren in Inteinen und Exteinen erfolgt nach einer Konvention beschrieben in der Intein-Datenbank, und wird in dieser Form auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die Aminosäuren des Inteins und des C-Exteins werden jeweils durchnummeriert beginnend mit der N-terminalen Aminosäure (siehe Abbildung 2). Zur Unterscheidung werden die Aminosäuren des C-Exteins zusätzlich mit dem Vorzeichen „+“ gekennzeichnet. Die Aminosäuren des N-Exteins erhalten das Vorzeichen „-“. Hier erfolgt die Nummerierung in umgekehrter Richtung (C- zum N-Terminus).

Inteine können auch in Fusion mit heterologen N- und C-Exteinen aktiv sein, und somit als ein „biochemisches Werkzeug“ zur Verknüpfung verschiedener Proteine und/oder Peptidsequenzen eingesetzt werden. Dabei ist besonders bemerkenswert, dass bei dieser Verknüpfung eine native Peptidbindung an der Ligationsstelle ausgebildet wird. Außerdem ist es gelungen, durch gezielte Punktmutagenese die Spleißreaktion an verschiedenen Stellen des Reaktionsprozesses zu unterbrechen und selektiv eine Spaltungsreaktionen des N- oder des C-Exteins auszulösen. Dieser Aspekt stellt ebenfalls einen interessanten biochemischen Anwendungsbereich dar. So können Zielproteine z.B. in Fusion mit einem kontrollierbar selbstspaltenden Intein-Affinitätsmarker zunächst über chromatographische Methoden gereinigt werden (üblicherweise eine Chitinbindende-Domäne), um anschließend mit Hilfe

des selbstspaltenden Inteins den gesamten Marker vom Zielprotein abzutrennen [25-29]. Auch die Generierung von Proteinen mit C-terminaler Thioesterfunktion oder N-terminalem Cystein, als unentbehrliches Startmaterial für die *Expressed Protein Ligation* (siehe Abschnitt 2.2.3.2), kann mit Hilfe der Inteine realisiert werden [5]. Weitere interessante Anwendungen stellen z.B. die Synthese von zyklischen Peptiden und Proteinen [30-32], das *trans*-Proteinspleißen (siehe Abschnitt 2.1.2), die segmentelle Isotopenmarkierung [33-35] oder die selektive Immobilisierung von Proteinen an festen Oberflächen dar [36]. Zusammenfassend verdeutlicht diese Aufzählung an Einsatzgebieten von Inteinen das breite Spektrum dieses „biochemischen Werkzeugs“.

Allerdings werden nicht alle beliebigen Exteinssequenzen von jedem Intein in gleicher Weise toleriert. Besonders für die Durchführung einer erfolgreichen Spleißreaktion ist für die meisten Inteine eine gewisse Anzahl an nativen flankierenden Aminosäuren erforderlich, welche dann auch im Spleißprodukt verbleiben. Die N- oder C-terminalen Spaltungsreaktionen scheinen weniger stark von den Exteinen beeinflusst zu sein, aber auch hier kann nicht immer jede beliebige Aminosäure in direkter Nachbarschaft zur Spleißposition vorliegen. Die Regeln zur Aktivität von Inteinen im Kontext heterologer Exteinssequenzen müssen für jedes Intein gesondert betrachtet und systematisch untersucht werden, so dass beim Einsatz eines neuen Exteins seine Kompatibilität mit dem jeweiligen Intein experimentell getestet und eventuell optimiert werden muss.

2.1.1 Mechanismus des Proteinspleißens

Der für die meisten Inteine zutreffende Mechanismus des Proteinspleißens lässt sich in vier Reaktionsschritte aufteilen. Diese wurden bereits mehrfach in verschiedenen Review-Artikeln beschrieben [8-11] und sind in Abbildung 3 dargestellt.

1. Mit Hilfe der nukleophilen Aminosäure am N-Terminus des Inteins (Motiv A) erfolgt ein N→O- (Serin) bzw. N→S-Acyltransfer (Cystein).
2. Dieser gebildete reaktive Oxo- bzw. Thioester wird vom zweiten Nukleophil am N-Terminus des C-Exteins (Serin, Cystein oder Threonin) angegriffen, und es erfolgt die Bildung eines verzweigten Intermediates durch eine intramolekulare Umesterung. Hierbei werden die beiden Exteine über eine Oxo- bzw. Thioesterbindung miteinander verknüpft.
3. Durch die Zyklisierungsreaktion des konservierten Asparagins oder Glutamins am C-Terminus des Inteins (Motiv G) wird dieses als Succinimid-Derivat abgespalten.

4. Der letzte spontan und irreversibel ablaufende Reaktionsschritt ist der $O \rightarrow N$ - (Serin, Threonin) bzw. $S \rightarrow N$ -Acyltransfer (Cystein), und damit die Ausbildung der nativen Peptidbindung an der Ligationstelle von N- und C-Extein.

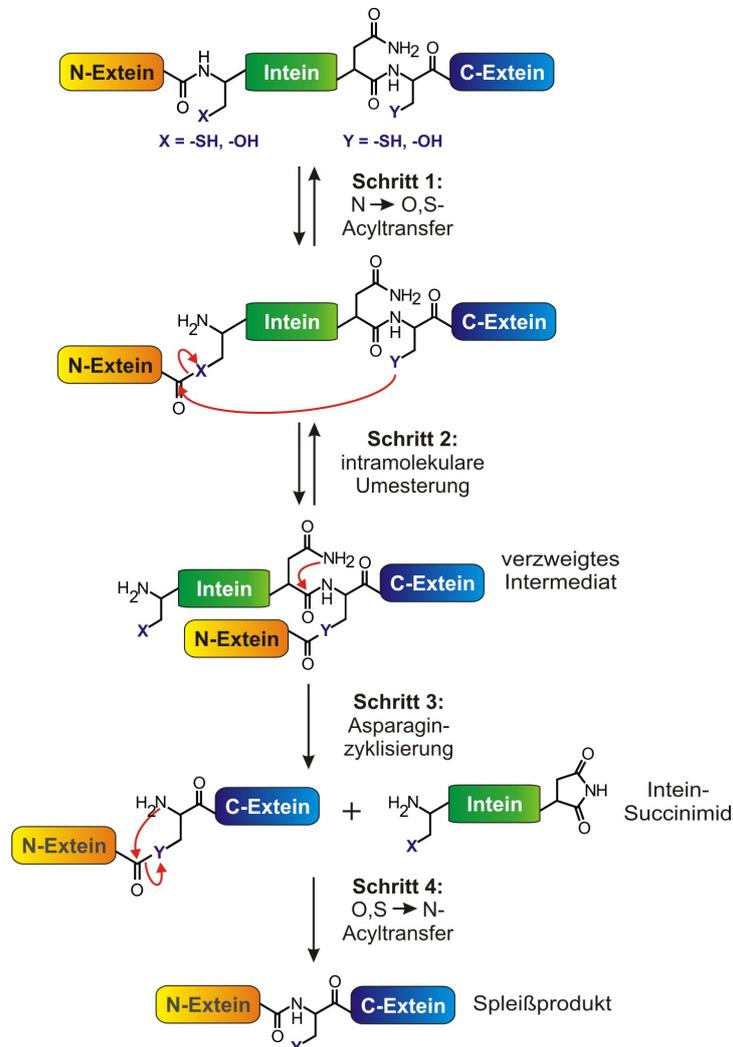


Abbildung 3. Der Mechanismus der Proteinspleißreaktion. Diese Reaktion beinhaltet vier nukleophile Umlagerungsschritte. Dabei werden zwei Peptidbindungen gespalten und eine neue Peptidbindung geknüpft. Im ersten Reaktionsschritt wird durch den Angriff der nukleophilen Aminosäureseitenkette am N-Terminus des Inteins (X) ein reaktiver Thio- bzw. Oxoester gebildet. Durch eine intramolekulare Umesterung mittels einer zweiten nukleophilen Seitenkette am N-Terminus des C-Exteins (Y) entsteht ein verzweigtes Intermediat. Schließlich zyklisiert das konservierte Asparagin am C-Terminus des Inteins, wodurch dieses als Succinimid-Derivat abgespalten wird. Mittels des finalen und irreversiblen $O,S \rightarrow N$ -Acyltransfers wird eine stabile Peptidbindung zwischen den beiden Exteinen ausgebildet.

Da die ersten drei Reaktionsschritte in Proteinen normalerweise nicht spontan ablaufen, müssen sie durch das Intein „katalysiert“ werden. Ein Intein wird daher auch als „single-turnover Enzym“ bezeichnet. Bemerkenswerterweise ergaben Untersuchungen mit punktmutierten Inteinen, dass alle drei Schritte unabhängig voneinander ablaufen können und die Induktion einer N- oder C-terminalen Spaltungen gezielt induziert und für verschiedene

Anwendungsgebiete ausgenutzt werden kann [11, 27, 37]. So kann z.B. mittels einer Mutation der nukleophilen Aminosäure am N-Terminus des C-Exteins, aufgrund einer Inhibierung der Umesterungsreaktion, eine Abspaltung des N-Exteins durch Hydrolyse oder Thiolyse ausgelöst werden. Dies gelingt ebenfalls bei einer Mutation des konservierten Asparagins an der C-terminalen Spleißposition. Durch eine Mutation des Cysteins oder Serins an der N-terminalen Spleißstelle kann die Freisetzung des C-Exteins induziert werden. Das Intein schafft es also, alle drei Reaktionen unabhängig voneinander zu „katalysieren“ und so miteinander zu koordinieren, dass lediglich das gewünschte Spleißprodukt entsteht. Störungen dieser perfekt abgestimmten Maschinerie, wie z.B. heterologe Exteinsequenzen oder nicht-physiologische Reaktionsbedingung, können aber sehr wohl zum Auftreten eben genannter Nebenprodukte führen [28, 38, 39].

Erwähnenswert ist weiterhin das Auftreten einiger funktionsfähiger Inteine mit einem N-terminalen Alaninrest (z.B. das *Mja* KlbA-Intein). Ein solches Intein kann nicht nach dem eben beschriebenen Katalysemechanismus funktionieren. Wahrscheinlich ist dagegen ein alternativer Weg bestehend aus nur drei Katalyseschritten, bei dem das Nukleophil an der C-terminalen Spleißposition direkt die Peptidbindung an der N-terminalen Spleißstelle angreift [40].

2.1.1.1 Der N→O- und N→S-Acyltransfer

In Proteinen treten Acylumlagerungen immer in benachbarter Position zu Serin, Threonin oder Cystein auf, indem die Seitenkettengruppen dieser drei Aminosäuren die Carbonylgruppe der davorliegenden Peptidbindung nukleophil angreifen. Theoretisch verläuft diese Reaktion dabei über ein Oxyoxazolidin- bzw. ein Oxythiazolidin-Anion-Intermediat, welches aber im Kontext der Proteinspleißreaktion aufgrund seiner hohen Reaktivität bislang nicht nachgewiesen werden konnte. Spontane N→O- oder N→S-Acylumlagerungen treten unter physiologischen Bedingungen nicht auf, aber sie können unter sehr starken sauren Bedingungen (konzentrierte Schwefelsäure oder wasserfreies Hydrogenfluorid) induziert werden [41]. Wie es das Intein schafft, diesen thermodynamisch ungünstigen Reaktionsschritt überhaupt zu katalysieren, ist trotz intensiver Forschung immer noch nicht eindeutig geklärt. Verschiedene kristallographische [42-47] oder NMR-technische Untersuchungen [48] lieferten vermehrt Hinweise darauf, dass die zu spaltende Peptidbindung an der N-terminalen Spleißstelle in einer verzerrten *trans*- oder sogar *cis*-Konfiguration vorliegt, was diese Bindung für einen nukleophilen Angriff der folgenden Aminosäure aktiviert. Von essentieller Bedeutung für diese Aktivierung ist ein hoch konserviertes Histidin aus Motiv B [48]. Wie in

Abbildung 4 am Beispiel der Kristallstruktur des *Mxe* GyrA Inteins gezeigt [44], befindet sich besagtes Histidin (im *Mxe* GryA-Intein His75) in geeigneter Position zur Protonierung des Amid-Stickstoffs der zu spaltenden Peptidbindung. Die ebenfalls konservierten Aminosäuren Thr72 und Asn74 des gleichen Motivs haben keine essentielle Funktion für das Proteinspleißen, aber eine Mutation beider Aminosäuren vermindert die Ausbildung des N-terminalen Thioesters deutlich [48]. Ihre Funktion liegt wahrscheinlich in der Ausbildung eines „Oxy-Anionenlochs“, welches den Oxythiazolidin-Übergangszustand stabilisiert.

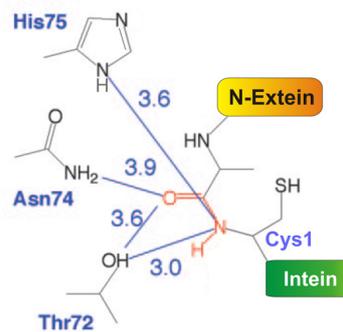


Abbildung 4. Die N-terminale Spleißstelle im *Mxe* GyrA Intein. Dargestellt ist die genaue Positionierung der Motiv B-Aminosäuren (Thr72, Asn74, His75) in Bezug zur Peptidbindung an der N-terminalen Spleißstelle (rot) anhand von Kristallstrukturdaten. Die hierbei möglichen Wechselwirkungen durch Wasserstoffbrückenbindungen sind in blau mit den entsprechenden Abständen in Å dargestellt (Quelle [48]).

2.1.1.2 Die intramolekulare Umesterung

Die Umesterung ist normalerweise eine reversible Reaktion, welche starke Nukleophile benötigt. Beim Proteinspleißen findet die Umesterung zwischen einem Thiol und einem Thioester, einem Alkohol und einem Oxoester, genauso wie zwischen einem Alkohol und einem Thioester statt. Während in den ersten beiden Beispielen unter neutralen Bedingungen die Gleichgewichtskonstante im Bereich von 1 liegt, ist die Umesterung vom Thioester zum Oxoester deutlich bevorzugt (Gleichgewichtskonstante ~ 50). In Untersuchungen zum *Mtu* RecA-Intein konnte der pK_S -Wert des Cysteins an der N-terminalen Spleißstelle mit 8,2 gemessen werden [49] (pK_S eines freien Cysteins $\sim 8,3$). Im Gegensatz hierzu betrug der pK_S -Wert des Cysteins am N-Terminus des C-Exteins nur 5,8, was darauf schließen lässt, dass die Umesterung durch diesen ungewöhnlich niedrigen pK_S -Wert angetrieben wird. Besonders bemerkenswert ist außerdem, dass von allen Schritten im Mechanismus des Proteinspleißens die Umesterung am sensitivsten auf äußere Störungen reagiert. So können die N- und C-terminalen Spaltungen häufig erfolgreich induziert werden, während eine Spleißproduktbildung nicht mehr auftritt.

2.1.1.3 Die Asparaginzyklisierung

Die Asparaginzyklisierung beinhaltet den nukleophilen Angriff des Amid-Stickstoffs der Asparaginseitenkette am C-Terminus des Inteins auf die Carbonylgruppe der folgenden Peptidbindung der Hauptkette. Von wichtiger, wenn auch nicht essentieller Bedeutung bei dieser Reaktion ist das davor liegende hochkonservierte Histidin (His153 im Motiv G), welches zur Ausbildung eines Oxy-Anionenlochs und damit zur Stabilisierung des tetraedrischen Übergangszustands während der Succinimidzyklisierung beiträgt [47]. Dies belegen Strukturdaten zum *Ssp* DnaB-Intein, die zusätzlich auch die Katalysefunktion eines weiteren Histidins (His143) im F-Motiv aufzeigen. His143 ist wahrscheinlich an der Deprotonierung der Seitenkette des katalytischen Asparagins beteiligt, wodurch ein nukleophiler Angriff auf die folgende Peptidbindung ermöglicht wird [47]. Schließlich wird das Intein als Succinimid-Derivat abgespalten, welches im weiteren Verlauf hydrolysiert wird. Die Geschwindigkeit dieser Hydrolyse ist stark pH- und temperaturabhängig. Die Halbwertszeit bei pH 7,4 und 37°C beträgt 17 Stunden in einem untersuchten Modellsystem [50]. Succinimidebildung ist ebenfalls ein Produkt bei der Proteinalterung und der dabei vorkommenden Desaminierung von internen Asparaginresten in Proteinen [51]. Dabei wird das Succinimid durch einen Angriff des Amidstickstoffs aus der Hauptkette auf die Carbonylgruppe der Asparaginseitenkette gebildet. Das Intein muss daher für den Erfolg der Spleißreaktion sicherstellen, dass lediglich die gewünschte Asparaginzyklisierung stattfindet.

2.1.1.4 Der S→N- und O→N-Acyltransfer

Der finale S→N- oder O→N-Acyltransfer ist ein irreversibler und nicht auf die Katalyse des Inteins angewiesener Schritt. Er stellt durch die Bildung der stabilen Peptidbindung die thermodynamische Triebkraft des Proteinspleißens dar und sorgt dafür, dass die Reaktion unter physiologischen Bedingungen zur Vollständigkeit und irreversibel abläuft. Untersuchungen mit Modellpeptiden haben ergeben, dass der N→S-Acyltransfer bei pH 7,0 so schnell abläuft, dass die Reaktionsgeschwindigkeit nicht einmal gemessen werden kann [52].

2.1.2 Gespaltene Inteine und *trans*-Proteinspleißen

Allgemein können Inteine in drei Gruppen unterteilt werden: die Maxi-Inteine, die Mini-Inteine und die gespaltenen Inteine. Unter einem gespaltenen Intein versteht man ein Intein, dessen Hälften von zwei separaten Genabschnitten kodiert werden. Beide Genfragmente können entweder innerhalb eines Operons, oder komplett unabhängig voneinander transkribiert und translatiert werden. Für die Katalyse des Proteinspleißens müssen beide Fragmente zunächst miteinander assoziieren und durch Rück- und Umfaltungsprozesse wieder die aktive Inteinstruktur ausbilden (Abbildung 5), um anschließend das Proteinspleißen, wie in Abbildung 3 dargestellt, zu katalysieren. Damit unterscheidet sich das *trans*-Proteinspleißen vom bislang betrachteten *cis*-Proteinspleißen lediglich durch diesen vorgelagerten Assoziationsschritt.

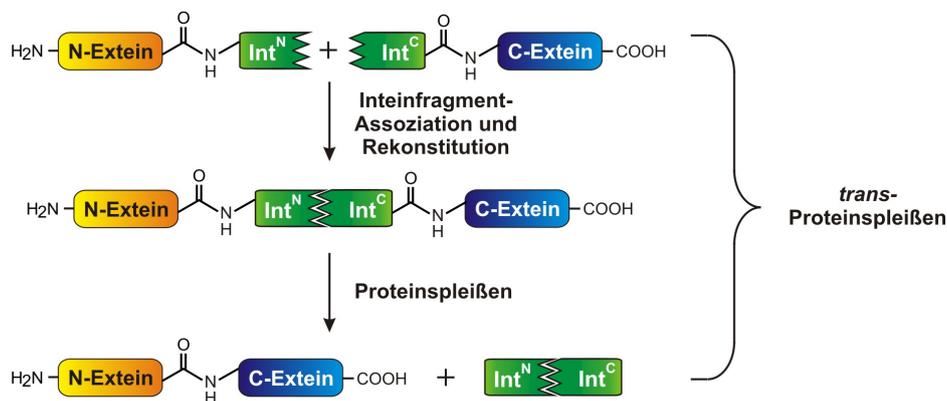


Abbildung 5. Darstellung des *trans*-Proteinspleißens mit einem gespaltenen Intein. Der Unterschied zwischen Proteinspleißen in *cis* und in *trans* besteht in einem vorgelagerten Assoziationsschritt der Inteinfragmente, bei dem die aktive Inteinstruktur erst rekonstituiert werden muss.

Dass dieser Prozess tatsächlich mit einem künstlich gespalten Intein ablaufen kann, wurde *in vivo* erstmals 1998 für das *Mtu* RecA-Intein gezeigt. Eine Deletion der in diesem Maxi-Intein enthaltenen Gensequenz der Endonukleasedomäne führte gleichzeitig zur Spaltung des Inteins in zwei ca. 100 Aminosäuren große N- und C-terminalen Inteinfragmente, welche die Spleißproduktbildung *in vivo* katalysierten [19]. Auch *in vitro* gelang die Rekonstitution zum aktiven *Mtu* RecA-Intein, allerdings nur nach Lösung beider getrennt exprimierter Inteinfragmente in Harnstoff- oder Guanidiniumhydrochlorid-haltigem Puffer und anschließender Dialyse gegen einen Puffer ohne diese denaturierenden Additive [53]. Weitere erfolgreiche Beispiele der künstlichen Spaltung von Inteinen und anschließendem *trans*-Proteinspleißen folgten, wobei große Unterschiede in den Reaktionsbedingungen auftraten. Für das *Psp* GB-D Pol Intein beispielsweise ist eine Konzentration von 0,36 M Harnstoff für

die Spleißreaktion unerlässlich, allerdings werden sogar 6 M Harnstoff vom Intein toleriert [54]. Für das künstlich gespaltene *Ssp* DnaB- [18, 55] (siehe auch Abschnitt 2.1.3) oder das *Mxe* GyrA-Intein [56] läuft die Spleißreaktion unter physiologischen Bedingungen spontan ab. Das gespaltene *Sce* VMA-Intein ist unter physiologischen Bedingungen inaktiv, kann allerdings mittels verschiedener regulierbarer Dimerisierungsdomänen aktiviert werden (Rapamycin-FKBP/FRB-System [57], Rapamycin-F_M/F_M-System [58] oder Photodimerisierung [59]). Und nicht nur gespaltene Inteine können extern durch die Zugabe eines kleinen Moleküls reguliert werden, auch für das *cis*-spleißende *Mtu* RecA Intein wurde ein System zur Aktivierung durch Zugabe des kleinen synthetischen Moleküls 4-Hydroxytamoxifen [60] oder des Thyroid Hormons [61] etabliert.

Eine wichtige Entdeckung im Forschungsgebiet der gespaltenen Inteine stellte die Identifizierung nativ gespaltenen Inteine dar [62-64]. Das am besten charakterisierte Intein dieser Klasse ist das *Ssp* DnaE-Intein, mit dessen Hilfe die essentielle α -Untereinheit der DNA-Polymerase III aus zwei Proteinhälften, deren kodierende Gensegmente 745 kbp auseinander liegen, zusammen gespleißt wird [62]. Bezogen auf alle bislang bekannten gespaltenen Inteine (nativ oder künstlich an der Insertionsposition der Endonuklease) besteht die N-terminale Spleißregion im Durchschnitt aus 100-150 Aminosäuren, während die C-terminale Hälfte ca. 35-50 Aminosäuren umfasst.

2.1.3 Das *Ssp* DnaB-Intein

Das im Zentrum dieser Arbeit stehende *Ssp* DnaB-Intein aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. (*Ssp*) Stamm PCC6803 besteht in seiner nativen Form aus 429 Aminosäuren. Das Gen dieses Inteins ist „in-frame“ in die DNA-Sequenz der DNA-Helikase *dnaB* inseriert. Wie jedes Maxi-Intein enthält auch das DnaB-Intein in der Mitte seiner Sequenz eine zusätzliche Endonukleasedomäne (275 Aminosäuren). Eine Deletion dieser Sequenz, und die gleichzeitige Religation der beiden entstehenden Inteinfragmente, erzeugte ein künstliches aus 154 Aminosäuren aufgebautes und enzymatisch voll aktives Mini-Intein [18]. Durch die Substitution des Endonukleasegens gegen eine kurze Sequenz aus Stopcodon-Ribosomenbindestelle-Startcodon konnten Liu und Mitarbeiter ein Operon aus zwei Genen, und damit ein gespaltenes DnaB-Intein erzeugen, welches in *E. coli* aktiv war [18]. Die rekombinante Expression und Aufreinigung beider Inteinfragmente getrennt voneinander (Int^N = 105 Aminosäuren, Int^C = 49 Aminosäuren) ermöglichte es, die Spleißreaktion auch unter physiologischen Bedingungen *in vitro* durchzuführen [55]. Die Lösung der Kristallstruktur des *Ssp* DnaB-Mini-Inteins im Jahr 2003 [47] entsprach dem

hufeisenförmigen HInt-Modell (Hedgehog-Intein-Modell [65], siehe Abbildung 6) anderer bereits bekannter Intein-Kristallstrukturen (*Sce* VMA [42, 45, 66], *Pfu* RIR1-1 [43], *Mxe* GyrA [44], *Ssp* DnaE [46]). Die N- und C-terminalen Inteinhälften sind in dieser Struktur über eine Vielzahl von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen eng miteinander assoziiert. Die N- und C-terminalen Spleißpositionen sind in der Mitte der Hufeisenstruktur zentriert und entsprechen zwei eigenständigen katalytischen Zentren ohne strukturelle Gemeinsamkeiten. Außerdem konnte für die zu spaltende Peptidbindung an der C-terminalen Spleißposition eine verzerrte *trans*-Konformation beschrieben werden, was ein bereits bekanntes Phänomen von strukturellen Daten des *Mxe* GyrA Inteins [44, 48] oder des *Sce* VMA-Inteins [45, 66] darstellte.

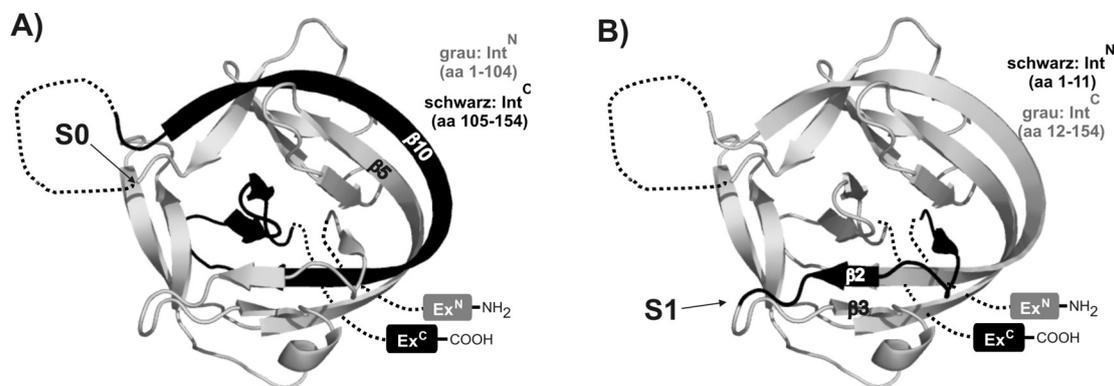


Abbildung 6. Kristallstruktur des *Ssp* DnaB-Mini-Inteins mit zwei verschiedenen Spaltpositionen S0 und S1. A) Durch eine Spaltung des DnaB-Inteins an der Position S0 entstehen die zwei Inteinfragmente Int^N (grau) und Int^C (schwarz), welche über die Ausbildung einer großen antiparallelen β -Faltblattstruktur ($\beta 5$ und $\beta 10$) miteinander interagieren. Die Position S0 entspricht der Insertionsposition der entfernten Endonukleasedomäne. **B)** Bei einer Spaltung an Position S1 entsteht ein lediglich aus 11 Aminosäuren aufgebautes Int^N- (schwarz) und ein großes Int^C-Fragment (grau). Beide Fragmente interagieren lediglich über die Ausbildung des kleinen antiparallelen β -Faltblatts $\beta 2$ und $\beta 3$. Diese Abbildung wurde mittels der PDB-Datei 1MI8 erstellt [47].

Basierend auf der erwähnten Methode der Erzeugung eines Zwei-Gen-Operons wurde in weiterführenden Studien das *Ssp* DnaB-Intein systematisch auf alternative Spaltungspositionen untersucht [67]. Insgesamt wurden 13 neue Spaltungen hauptsächlich innerhalb von flexiblen „Loop-Regionen“ getestet. Hierbei konnten neben der bereits bekannten Spaltung an der Insertionsposition der Endonuklease (siehe Abbildung 6A, Position S0) vier neue Spaltungsstellen identifiziert werden, welche detektierbare Mengen an Spleißprodukt *in vivo* lieferten. Während drei dieser neuen Positionen in näherer Umgebung der Schnittstelle S0 lokalisiert waren, erfolgte eine Spaltung lediglich 11 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt (Abbildung 6B, Position S1). Die Spleißausbeute dieses gespaltenen Inteins *in vivo* war allerdings deutlich reduziert und betrug im Vergleich zum Endonuklease-

gespaltenen Intein lediglich 48%. Eine solche Spaltposition ist aber dennoch außerordentlich interessant für potentielle Anwendungen im Bereich der Protein-Semisyntese (siehe Kapitel 2.2), da das sehr kleine N-terminale Inteinfragment durch Festphasenpeptidsynthese viel leichter zugänglich ist, als alle bislang bekannten Fragmente gespaltener Inteine. Für die Assoziation des S0-gespaltenen Inteins konnte die Ausbildung einer besonders langen antiparallelen β -Faltblattstruktur herangezogen werden (Wechselwirkung β 5 und β 10, Abbildung 6A). Im Gegensatz hierzu konnte bei einer Interaktion der Inteinfragmente resultierend aus einer Spaltung an Position S1 lediglich ein sehr kurzes antiparalleles β -Faltblatt aufgebaut werden (Wechselwirkung β 2 und β 3, Abbildung 6B), was die Funktionalität dieses gespaltenen Inteins umso erstaunlicher machte, gleichzeitig aber auch Erklärungsansätze für die deutlich reduzierten Spleißausbeuten lieferte. Weiterhin konnten Liu und Mitarbeiter zeigen, dass Spleißaktivität selbst dann noch detektierbar war, wenn das *Ssp* DnaB-Intein durch die Generierung eines Drei-Gen-Operons in drei Fragmente gespalten war (Spaltung an S0 und S1) [67].

2.2 Protein-Semisyntese

Jedes semisyntetische Protein kann durch seinen Aufbau aus mindestens zwei Komponenten charakterisiert werden. Die eine Komponente stellt entweder ein natives oder ein durch rekombinante Genexpression generiertes Protein dar. Die zweite Komponente ist im Gegensatz hierzu synthetisch hergestellt und kann im Prinzip jede beliebige chemische Struktur einnehmen. Am häufigsten wird der Begriff der Protein-Semisyntese in Verbindung mit der Verknüpfung eines rekombinanten/nativen Proteins mit einem synthetischen Peptid verwendet. Während mittels der ribosomalen Proteinbiosynthese Proteine nahezu ohne Größenlimitation produziert werden können, liegt der Nachteil eines solchen Ansatzes in seiner Beschränktheit auf die 20 proteinogenen Aminosäuren. Durch die organische Synthese lassen sich beliebige Modifikationen und unnatürliche Aminosäurebausteine herstellen und mittels der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) in Peptide einbauen. Allerdings können solche Peptidsequenzen üblicher Weise eine Länge von ca. 50 Aminosäuren nicht überschreiten [68]. Der große Nutzen der Protein-Semisyntese liegt in der Kombination der Stärken von organischer Synthese und ribosomaler Proteinbiosynthese, und ebnet damit den Weg zur generellen Darstellung von Zielproteinen nahezu ohne Größenlimitation mit verschiedensten chemischen Modifikationen (für Übersichtsartikel siehe [2-5, 69-72]).

Mit Hilfe der Protein-Semisyntese können unterschiedliche chemische Reportergruppen und Modifikationen mit dem zu untersuchenden Zielprotein verknüpft werden, was die Durchführung vieler biochemischer Analysemethoden ermöglicht. Einige wichtige Beispiele hierfür sind nachfolgend aufgelistet.

- 1) Einbau von unnatürlichen Aminosäure-Analoga, z.B. für mechanistische Untersuchungen von Enzymen.
- 2) Modifikationen mit isotopenmarkierten Aminosäuren für die NMR-Spektroskopie.
- 3) Einbringen von Fluoreszenzmarkern zur Fluoreszenz-Spektroskopie (FRET-Messungen bei Einbau mehrerer Fluorophore in enger räumlicher Nähe).
- 4) Einbau von chemischen Vernetzungsmolekülen (Crosslinkern) zur Untersuchung von Protein/Protein-Wechselwirkungen.
- 5) Selektive Einführung von posttranslationalen Modifikationen.
- 6) Kovalente Verknüpfung mit Affinitätsmarkern (z.B. Biotin).
- 7) Polymermodifikationen zur Verbesserung der Proteinstabilität (z.B. PEGylierung).
- 8) Einführung von Modifikationen zur räumlichen und zeitlichen Kontrolle von Proteinen (z.B. photoreaktive Schutzgruppen).

Um eine chemische oder enzymatische Reaktion erfolgreich zur Verknüpfung der synthetischen und nativen/rekombinanten Komponente einzusetzen, muss diese Reaktion mehrere Bedingungen erfüllen. Zum Einen sollte sie sowohl chemo- als auch regioselektiv sein, denn je selektiver eine chemische Reportergruppe in seiner Art, seiner Anzahl und seiner Position in das Zielprotein eingeführt werden kann, desto wertvoller ist dieses Molekül in den verschiedenen biochemischen Untersuchungen. Außerdem sollte die Protein-Semisyntese unter physiologischen Bedingungen effizient ablaufen, d.h. in wässriger Lösung bei pH 6 - 8 und in einem Temperaturbereich von 4°C - 37°C. Idealerweise sollte die Reaktion auch in sehr komplexen Umgebungen, z.B. in Zellextrakten oder in einer lebenden Zelle, ausgeführt werden können. Hierfür müssen alle für die Reaktion verwendeten reaktiven Gruppen orthogonal zu den natürlichen Funktionalitäten einer Zelle sein, und die Reaktionsbedingungen dürfen keine toxischen Nebeneffekte hervorrufen. Alle diese Rahmenbedingungen schränken die in Frage kommenden Reaktionen deutlich ein. Eine Übersicht der bis heute etablierten semisynthetischen Methoden ist in den folgenden Kapiteln wiedergegeben.

Beim Umgang mit dem Begriff der Protein-Semisynthese bleibt zu erwähnen, dass dieser in der Literatur nicht immer eindeutig gewählt ist. Die allgemeinste Definition beschreibt die Protein-Semisynthese als Konjugation eines ribosomal generierten Proteins mit einer synthetischen Komponente (Abbildung 7A). Diese synthetische Komponente kann entweder ein Peptid oder auch jedes andere chemische Molekül darstellen, welches durch eine selektive Reaktion mit dem Zielprotein ligiert werden kann. Die exakte Position der selektiven Verknüpfung am Zielprotein ist beliebig, d.h. es kann z.B. über Aminosäureseitenketten, genauso wie über genetisch eingeführte „Tag-Strukturen“, ligiert werden, wobei in den allermeisten Fällen unnatürliche Strukturen an der Ligationsposition entstehen. In der Literatur sind viele Arbeiten zu einer solchen Art der Protein-Semisynthese bekannt und eine Übersicht der meisten bis heute etablierten Techniken ist in Abschnitt 2.2.2 aufgelistet. Allerdings wird der Begriff „Semisynthese“ in diesem allgemeinen Zusammenhang nur selten genutzt. Häufiger findet dagegen der Ausdruck der regioselektiven „Biotkonjugation“ Anwendung [1].

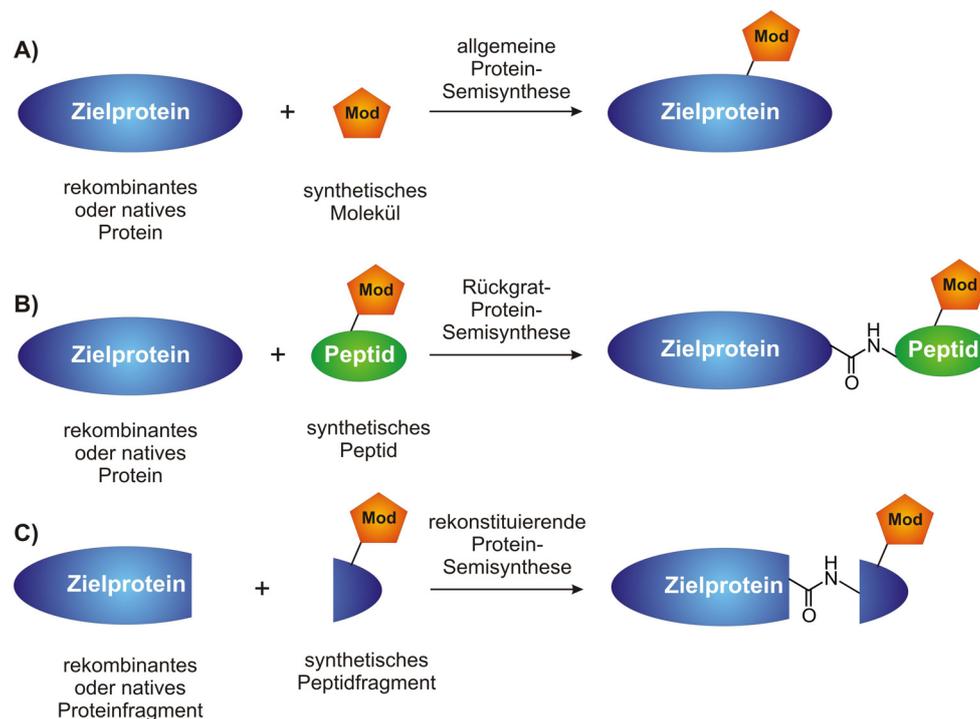


Abbildung 7. Definitionen der Protein-Semisynthese. A) Unter dem allgemeinen Begriff der Protein-Semisynthese versteht man die Verknüpfung eines nativen oder rekombinanten Proteins mit einer synthetischen Komponente. B) Eine stringenter Sichtweise definiert nur solche Proteine als semisynthetisch, die aus einer Rückgrat-Ligation eines rekombinanten/nativen Proteins und eines synthetischen Peptids entstanden sind. Dabei muss an der Ligationsstelle eine natürliche Peptidbindung ausgebildet worden sein. C) Am meisten einschränkend ist der Begriff der rekonstituierenden Protein-Semisynthese. Hier wird ein durch chemische Spaltung, Proteolyse oder Genexpression hergestelltes Proteinfragment mit dem entsprechenden synthetischen Peptidfragment über eine native Peptidbindung verknüpft und damit das vollständige Protein rekonstituiert.

Bei einer stringenteren Definition der Protein-Semisynthese wird lediglich das über eine native Peptidbindung am Proteinrückgrat verknüpfte Produkt eines Proteins und eines Peptids als semisynthetisch eingestuft (Abbildung 7B). Im Rahmen dieser Arbeit wird eine solche Art der Synthese daher als „Rückgrat-Protein-Semisynthese“ bezeichnet. Eine Veröffentlichung die in diesem Zusammenhang beispielhaft erwähnt werden kann, ist die von Giriat *et al.* in lebenden Zellen durchgeführte Fusion des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) mit einer kurzen FLAG-Tag enthaltenden Peptidsequenz, katalysiert durch ein gespaltenes Intein [73]. Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten semisynthetischen Spleißreaktionen gehören in diese Kategorie.

Ebenfalls eine Art der Rückgrat-Protein-Semisynthese, allerdings noch weiter eingeschränkt, ist in Abbildung 7C dargestellt. Bei dieser Definition sind nur solche Ligationsprodukte semisynthetischer Natur, bei denen Peptid und Protein ein in zwei Fragmente gespaltenes Protein darstellen, welches durch die Fusion wieder rekonstituiert wird. Daher wird eine solche Reaktion im Folgenden als „rekonstituierende Protein-Semisynthese“ bezeichnet. Auch für solche Synthesen sind bereits mehrere Arbeiten in der Literatur bekannt. Stellvertretend sei die Verknüpfung des verkürzten rekombinant generierten Fragments des Kaliumkanalproteins KcsA (AS 1-68) mit einem synthetischen Peptid (AS 69-122) mittels *Expressed Protein Ligation* (EPL) erwähnt [74]. Durch den synthetischen Zugang der C-terminalen Proteinkanalhälfte konnte das Glycin an Position 77 durch einen Alaninrest in der *D*-Konfiguration ersetzt, und anschließend die Funktionalität dieses Kaliumkanals bestätigt werden. Damit wurde auf eindrucksvolle Weise die Notwendigkeit einer linkshändigen helikalen Konfiguration an Position 77 demonstriert.

Die kovalente Verknüpfung zwischen einem synthetischen Peptid und einem rekombinaten Protein ist keineswegs eine zwingende Voraussetzung für ein semisynthetisches Produkt. Allerdings gibt es nur selten ein Protein- und ein Peptidfragment, welche spontan in wässriger Lösung assoziieren und die native Proteinstruktur ausbilden. Ein positives Beispiel hierfür ist die mittels Subtilisin proteolytisch gespaltene Ribonuklease A. Das hierbei entstehende 20 AS große N-terminale Peptidfragment (S-Peptid) und das 104 AS große C-terminale Proteinsegment (S-Protein) bilden in Lösung spontan die zwar nicht kovalent verknüpfte, aber katalytisch aktive Ribonuklease S aus [75]. Durch die synthetische Darstellung des S-Peptids konnten bereits eine Vielzahl verschiedener semisynthetischer RNase S-Varianten dargestellt und z.B. für NMR-Untersuchungen mit spezifischen ¹⁹F- oder ¹³C-markierten Aminosäuren eingesetzt werden [76]. Und auch das in dieser Arbeit

verwendete Intein reiht sich in diese Kategorie der semisynthetischen, aber nicht kovalent verknüpften Proteine ein.

Abschließend sei bemerkt, dass in manchen Fällen auch die Ligation von lediglich synthetisch generierten Peptidfragmenten zu einem vollständigen Protein als ein semisynthetisches Produkt bezeichnet wird [77, 78]. Dies kann allerdings nicht mit denen in dieser Arbeit verwendeten Definitionen in Einklang gebracht werden und wird daher vernachlässigt.

2.2.1 Codon-basierter Einbau unnatürlicher Aminosäuren

Zum Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Proteine mit Hilfe des Translationsapparates können auxotrophe Bakterienstämme dienen, d.h. Stämme die eine bestimmte Aminosäure nicht selbst produzieren können, sondern darauf angewiesen sind, diese aus der Umgebung aufzunehmen. Durch Zugabe eines unnatürlichen, aber sehr analogen Aminosäurederivates kann dieses anstelle der nativen Form in alle translatierten Proteine eingebaut werden. Erfolgreich angewendet wurde ein solcher Ansatz z.B. zur Einführung von Phenyl- und Methioninderivaten mit bioorthogonalen Alkin-, Keto- oder Azid-Funktionalitäten [79-81], welche dann für weitere chemoselektive Konjugationsreaktionen eingesetzt werden konnten (siehe Kapitel 2.2.2.2). Der entscheidende Nachteil eines solchen Ansatzes liegt in der fehlenden Selektivität, d.h. der Einbau der „zugefütterten“ unnatürlichen Aminosäure erfolgt willkürlich in jedem produzierten Protein der Zelle.

Ein wesentlich breiter anwendbares Werkzeug zur Einführung unnatürlicher Aminosäurebausteine ist die von Schultz und Mitarbeitern etablierte „Nonsense-Codon-Unterdrückung“ (Übersichtsartikel [2]). Der Schlüssel dieses Ansatzes liegt in der Unterdrückung der Termination der Translation (Amber Stopcodon) mit Hilfe eines modifizierten t-RNA-Moleküls, welches mit der entsprechend einzuführenden nicht-proteinogenen Aminosäure beladen ist. Zunächst konnte dieser Prozess lediglich *in vitro* durchgeführt werden [82]. Mit der Entwicklung eines orthogonalen tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase Paares gelang die selektive Beladung der modifizierten tRNA mit der nicht-proteinogenen Aminosäure enzymatisch katalysiert, wodurch das System erfolgreich auch *in vivo* funktionierte. Folglich konnte der genetische Code des Prokaryoten *E. coli* [83] sowie des Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* [84] um mehr als 20 unnatürliche Aminosäuren erweitert werden, wodurch unter anderem verschiedenste bioorthogonale Gruppen, posttranslationale Modifikationen, Fluorophore oder photoschaltbare Gruppen gezielt in Proteine eingebracht wurden [85]. Kürzlich konnte ein orthogonales

Ribosom(RiboX)/mRNA-Paar etabliert werden, welches parallel zum nativen Ribosom funktioniert und eine deutlich geschwächte Affinität zum kompetitiven Releasefaktor I aufweist. Hierdurch konnten Nachteile, wie geringe Ausbeuten, frühzeitige Termination oder Toxizitätseffekte, deutlich verbessert werden [86]. Allerdings ist auch mit einem solchen Ansatz der Einbau lediglich einer, maximal zwei unnatürlicher Aminosäuren praktikabel.

2.2.2 Allgemeine Protein-Semisyntese

In diesem Abschnitt sollen verschiedene Methoden zur Darstellung von semisynthetischen Proteinen im allgemeinen Sinn (Abbildung 7A) vorgestellt werden. Eine wichtige Gemeinsamkeit aller hier genannter Ansätze besteht darin, dass die selektive Verknüpfung von synthetischer und rekombinanter/nativer Komponente nicht mittels einer nativen Peptidbindung am Proteinerückgrat erfolgt, sondern an beliebigen anderen Positionen im Protein und/oder über alternative Strukturen an der Ligationsstelle.

2.2.2.1 Biokonjugation über die natürlichen Aminosäureseitenketten

Das klassische Beispiel zur allgemeinen Protein-Semisyntese ist die selektive chemische Modifikation einer Aminosäureseitenkette. Die Selektivität dieser Reaktion ist abhängig von der Anzahl und der Reaktivität der jeweiligen Aminosäure im Protein, wobei die Reaktivität von den lokalen sterischen und elektronischen Faktoren beeinflusst wird (Übersicht [1]). Ein wichtiger Vorteil dieser Methode ist die große Anzahl der zur Verfügung stehenden und kommerziell erhältlichen Reagenzien. Ein entscheidender Nachteil aber liegt in der Chemo- und Regioselektivität, falls mehrere ähnlich reaktive Funktionalitäten oder mehrere gleiche Aminosäuren in einem Protein vorhanden sind. Außerdem ist mit einem solchen Ansatz eine selektive Modifikation in lebenden Zellen nicht möglich.

Die Cysteinseitenkette ist der wohl am häufigsten genutzte Rest zur direkten Biokonjugation. Das liegt daran, dass bei neutralem pH-Wert die Thiolgruppe im Vergleich zu allen deren Aminosäureseitenketten die größte Nukleophilie aufweist. Außerdem stellt das Cystein eine relativ selten vorkommende proteinogene Aminosäure dar, welche häufig ohne signifikante Störungen der Proteinstruktur genetisch codiert in ein Zielprotein eingebracht werden kann. Cysteine können bei neutralem pH-Wert und Raumtemperatur selektiv mit Reagenzien wie Alky- und Arylhalogeniden, Maleinimiden (Abbildung 8A(I)) oder Halogenacetamiden (Abbildung 8A(II)) alkyliert oder mittels einer Disulfid-

Austauschreaktionen (Abbildung 8A(III)) markiert werden. Leider sind Cysteine häufig Bestandteile katalytischer Zentren oder aufgrund von Disulfidbrückenbildung wichtige strukturgebende Elemente, wodurch eine Biokonjugation entweder verhindert wird, oder aber eine Modifikation zum Verlust der Funktionalität des Proteins führt.

Aminogruppen in Proteinen werden zumeist durch acylierende Reagenzien modifiziert. Dabei ist die Reaktivität der Aminogruppe stark vom pH-Wert abhängig. Da Lysinseitenketten nur mäßig basisch sind (pK_S ca. 9,3 - 9,5), ist ihre Reaktivität bei einem pH-Wert kleiner 8,0 nur gering. Dementsprechend sind Acylierungsreaktionen mit Reagenzien wie N-Hydroxysuccinimid-Estern (Abbildung 8B(IV)), Isocyanaten oder Isothiocyanaten (Abbildung 8B(V)) in einem pH-Bereich von 8,5 bis 9,5 optimal. Die α -Aminogruppe am N-Terminus eines jeden Proteins zeigt im Vergleich zum primären Amin der Lysinseitenkette einen deutlich niedrigeren pK_S -Wert (ca. 7,6 - 8,0) und kann daher selektiv unter neutralen Bedingungen modifiziert werden.

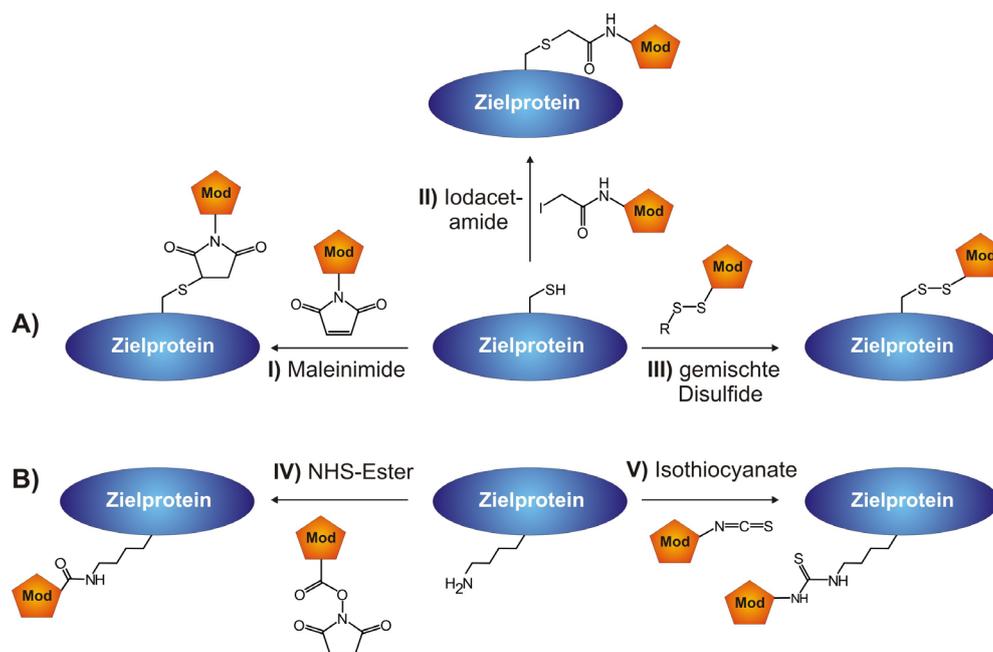


Abbildung 8. Selektive Biokonjugation von Cystein- oder Lysinseitenketten. A) Dargestellt sind die am häufigsten verwendeten Modifikationsreagenzien für Cysteine. Maleinimide reagieren mittels Michael-Addition (I) und Iodacetamide durch nukleophile Substitution (II) zum Thioether. Gemischte Disulfide reagieren mittels einer Disulfid-Austauschreaktion (III). B) Die am häufigsten verwendeten Reagenzien zur selektiven Modifikation von Lysinresten sind N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester, IV) oder Isothiocyanate (V), wobei eine Amid- bzw. Thioharnstoffbindung ausgebildet wird.

Eine andere Möglichkeit zur selektiven Modifikation N-terminaler Serin- oder Threoninreste besteht in der Oxidation der Alkoholgruppe mit Periodat zur Aldehydfunktion [87]. Die Aldehydfunktion stellt eine bioorthogonale Gruppe dar (siehe Kapitel 2.2.2.2) und kann selektiv mit Hydrazin-, Hydroxyl- oder Aminderivaten weiterreagieren.

Weitere Beispiele selektiver Konjugationsreaktionen von Aminosäureseitenketten sind die elektrophile aromatische Substitution an Tyrosinresten [88, 89], Rhodium-katalysierte Reaktionen an Tryptophanen [90] oder die Funktionalisierung der Carboxylatreste in Glutamat oder Aspartat durch z.B. Carbodiimid-Reagenzien [1].

2.2.2.2 Bioorthogonale chemische Konjugationsmethoden

Einen anderen wichtigen Teilbereich der allgemeinen Protein-Semisynthese stellen die chemoselektiven Konjugationsmethoden dar. Diese Strategien basieren auf chemischen Verknüpfungsreaktionen mittels reaktiver Gruppen, welche orthogonal zu allen natürlich vorkommenden Funktionen in Proteinen sind. Mit Hilfe der in Abbildung 9 dargestellten Übersicht an Konjugationsmethoden können, im Einklang zur Definition der allgemeinen Protein-Semisynthese, native oder rekombinante Proteine mit einem synthetischen Molekül konjugiert werden. In allen gezeigten Beispielen entstehen auf diese Weise nicht-native Strukturen an der Ligationsstelle. Dabei ist es prinzipiell egal welche bioorthogonale Gruppe sich am Zielprotein und welche sich an der synthetischen Komponente befindet, so dass nicht nur die in Abbildung 9 dargestellten Kombinationen möglich sind, sondern auch die jeweils umgekehrten Anordnung. Während die bioorthogonale Gruppe in die synthetische Komponente durch organische Synthese bzw. Festphasenpeptidsynthese eingebracht werden kann, muss das Protein durch andere Ansätze, z.B. Modifikationen von Aminosäureseitenketten (Abschnitt 2.2.2.1), chemoenzymatische Reaktionen (Abschnitt 2.2.2.3) oder dem Codon-spezifischen Einbau unnatürlicher Aminosäuren (Abschnitt 2.2.1), bioorthogonal funktionalisiert werden.

Die Thiazolidin-Ligation basiert auf der Idee der selektiven Kondensation einer Aldehydgruppe mit der N-terminalen α -Aminofunktion zum Imin (siehe Abbildung 9A). Imine sind in wässriger Lösung allerdings nicht stabil, können aber wie in diesem Fall mit Hilfe des β -funktionalisierten Amins (Cystein, Serin oder Threonin) über eine Thiazolidin- bzw. Oxazolidin-Ringbildung stabilisiert werden. Abschließend wird durch einen intramolekularen O \rightarrow N-Acyltransfer die ebenfalls eingeführte reaktive Esterbindung in die stabile Amidbindung umgewandelt und eine pseudo-Prolinstruktur an der Ligationsstelle ausgebildet [91]. Auch bei der Oxim-Ligation (Abbildung 9B) und der Hydrazon-Ligation (Abbildung 9C) wird die Reaktion einer Aldehyd- oder Ketofunktion mit einem primären Amin ausgenutzt. Durch die Verwendung eines Hydroxyl- bzw. Hydrazinderivats ist das entstehende Oxim bzw. Hydrazon auch unter physiologischen Bedingungen stabil [92]. Mit

einem solchen Ansatz, z.B. basierend auf Aminoxy-derivatisierten Sacchariden, konnten bereits erfolgreich verschiedene Glycoprotein-Mimetika hergestellt werden [93]. Eine andere Ligationsstrategie mittels Ringschluss kann durch die Diels-Alder-Reaktion erreicht werden, bei der ein Dien und ein Dienophil zu einem Cyclohexen reagieren (Abbildung 9D) [94]. Die nach Huisgen und Sharpless benannte 1,3-dipolare Cycloaddition erlaubt die bioorthogonale Verknüpfung eines Azids mit einem Alkin unter Ausbildung eines Triazolrings, auch bekannt als „Click-Chemie“ (Abbildung 9E). Allerdings muss diese Reaktion durch Cu(I) katalysiert werden [95], was für Anwendungen *in vivo* einen entscheidenden Nachteil bedeutet. Bertozzi und Mitarbeiter konnten mittels reaktiver fluorierter und zyklisierter Alkinsubstrate (Abbildung 9F) die Kupfer-freie Click-Reaktion einführen [96] und erfolgreich Membran-assoziierte Glycoproteine in lebenden Zebrafischen visualisieren [97].

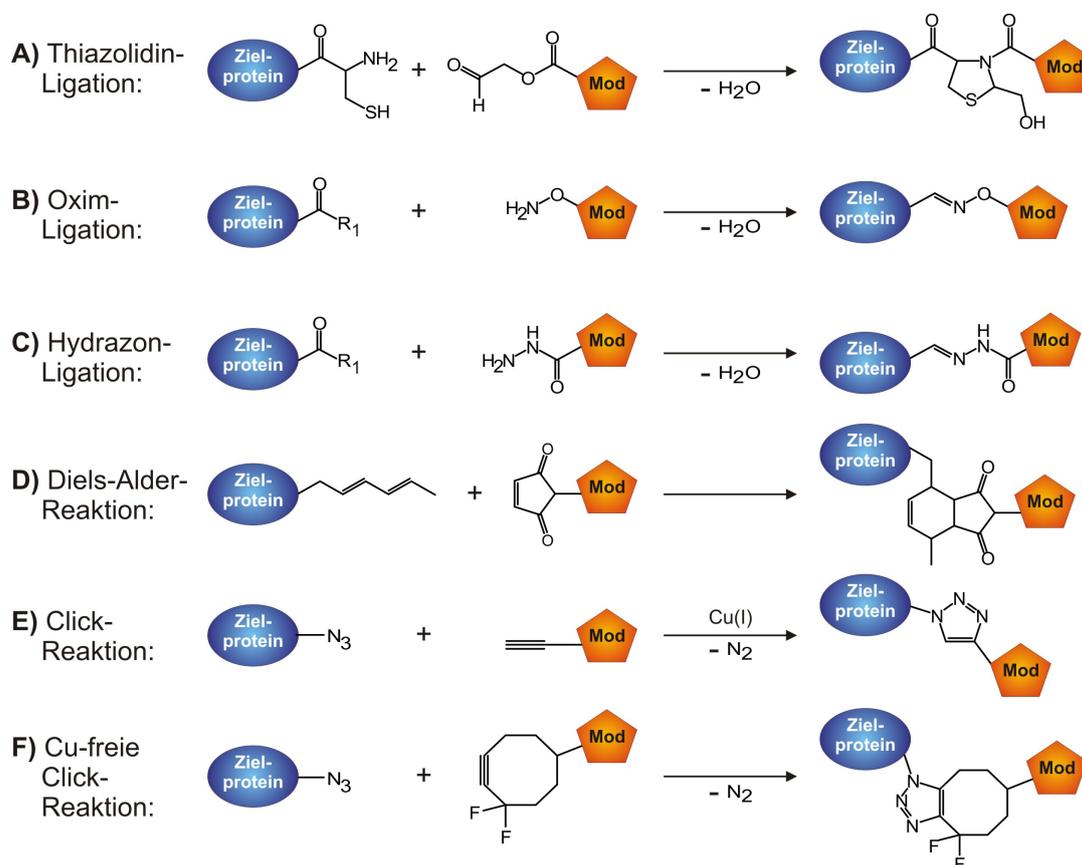


Abbildung 9. Bioorthogonale chemische Konjugationsreaktionen. Ein C-terminales Cystein reagiert mit einem Aldehyd zum Imin und durch eine Zyklisierung weiter zum Thiazolidin (A). Aldehyde ($R_1 = H$) oder Ketone reagieren mit Hydroxylaminen zu Oximen (B) oder mit Hydrazinen zu Hydrazone (C). Bei der Diels-Alder-Reaktion reagieren ein Dien und ein Dienophil unter Ausbildung eines Cyclohexens (D). Die 1,3 dipolare Cycloaddition (Click-Reaktion) gelingt Kupfer(I)-katalysiert mit einem Azid und einem Alkin (E), kann aber Ringspannungs-getrieben auch Kupfer-frei ablaufen (F). Prinzipiell können die hier gezeigten bioorthogonalen Gruppen auch in umgekehrter Anordnung eingesetzt werden, d.h. die funktionellen Gruppen an Zielprotein und Modifikation können vertauscht werden.

2.2.2.3 Chemoenzymatische Modifikationen von Fusionsproteinen

Ein grundsätzlich anderer Ansatz zur Darstellung von semisynthetischen Proteinen im allgemeinen Sinn basiert auf der enzymkatalysierten Modifikation von Fusionsproteinen. Ausgangspunkt solcher Ansätze ist die genetische Fusion eines Zielproteins mit einem Helferenzym oder Helferpeptid, um anschließend letzteren Teil mittels verschiedener synthetisch modifizierter Substratmoleküle zu markieren (siehe Abbildung 10A).

A

Fusionsprotein
Zielprotein
Helferprotein / Helferpeptid
▼ = spezifisches Substrat
Mod = verschiedene Modifikationen

B

	modifiziertes Substrat	Helferprotein Helferpeptid	zusätzliches Enzym
I	 alkylierte Guanin-Derivate	 207 AS humane O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase	—
II	 Biotin-Derivate X = NH oder CH ₂	 156 bzw. 14 AS Biotin-Carboxyl-Carrierprotein	Biotinligase (BirA)
III	 Coenzym A-Derivate	 80 bzw. 11 AS Acyl-/Peptidyl-Carrierprotein	Phosphopantetheinyl-Transferase
IV	 Phosphoisoprenoid-Derivate	 6 AS CAAX-Box	Farnesyltransferase
V	 Trimethoprim-Derivate	 157 AS Dihydrofolatreduktase	—
VI	—	 6 AS Aldehyd-Tag	Formylglycin-erzeugendes Enzym (FGE)

Abbildung 10. Übersicht chemoenzymatischer Modifikationsreaktionen von Fusionsproteinen. **A)** Durch eine Fusion des Zielproteins mit einem Helferprotein/-peptid kann letzterer Teil selektiv markiert werden. **B)** Durch die breite Substratspezifität der humanen O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) gelingt die kovalente Modifikation mittels Alkyl-Guanin-Derivate (I). An das Biotin-Carboxyl-Carrierprotein (BCCP) können mit Hilfe der Biotinligase A verschiedene Biotinderivate gekoppelt werden (II). Ein Acyl-Carrierprotein (ACP) oder Peptidyl-Carrierprotein (PCP) kann mit Coenzym A-Derivaten und einer Phosphopantetheinyl-Transferase selektiv modifiziert werden (III). Das C-terminale CAAX-Motiv dient als Erkennungssequenz der Farnesyltransferase, welche Phosphoisoprenoideinheiten über eine Thioetherbindung kovalent mit dem Fusionsprotein verknüpft (IV). Die Dihydrofolatreduktase (DHFR) bindet selektiv aber nicht kovalent verschiedene Trimethoprim-Derivate (V). Durch die posttranslationale Oxidation eines Cysteinrests zum Aldehyd mittels des Formylglycin-erzeugenden Enzyms (FGE) können Zielproteine in Fusion mit dem Aldehyd-Tag selektiv *in vivo* mit einer Aldehydfunktion versehen und weiter modifiziert werden (VI).

Die humane O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) ist ein DNA-Reparaturprotein, welches schädliche O⁶-Alkylierungen der Nukleinbase Guanin behebt, indem es die Alkylgruppe irreversibel auf sich selbst überträgt (Abbildung 10B(I)) [98]. Mit Hilfe der Fusion aus Zielprotein und hAGT kann durch Zugabe künstlicher O⁶-Benzylguanin-Derivate der hAGT-Teil kovalent modifiziert werden, wie bereits für verschiedenste Anwendungen zur Visualisierung von Proteinen in Säugerzellen [99], zum Protein-Crosslinken [100] oder zur Proteinimmobilisierung [101], geschehen. Eine andere enzymatisch katalysierte Modifikation nutzt die selektive Beladung des Biotin-Carboxyl-Carrierproteins (BCCP) mit Biotin durch die Biotinligase BirA aus *E. coli* (Abbildung 10B(II)). Die für BirA essentielle Erkennungssequenz im BCCP konnte auf nur 14 Aminosäuren reduziert werden, wodurch lediglich ein kleines genetisch kodiertes Helferpeptid mit dem Zielprotein fusioniert werden musste, um mittels verschiedenster Biotin-Derivate zu modifizieren [102]. Analog funktioniert das Prinzip der enzymatischen Modifikation durch die Übertragung von Coenzym A-Derivaten auf verschiedene Acyl- (Fettsäure- oder Polyketidsynthetasen) bzw. Peptidyl-Carrierproteine (nicht-ribosomale Peptidsynthetasen). Katalysiert wird diese Reaktion durch eine Phosphopantetheinyl-Transferase (Abbildung 10B(III)). Auch hier konnte die nötige Erkennungssequenz des Carrierproteins von ca. 80 Aminosäuren auf ein nur 11 Aminosäuren großes Motiv verkürzt werden [103]. Eine sehr kleine C-terminale Erkennungssequenz aus lediglich 6 Aminosäuren (TKCVIM) wird von der Farnesyltransferase erkannt (Abbildung 10B(IV)). Auf diesem Weg kann der Cysteinrest dieses als CAAX-Box bezeichneten Motivs (C = Cystein, A = aliphatische AS, X = beliebig) selektiv mit Phosphoisoprenoid-Derivaten modifiziert werden [104, 105]. Durch eine selektive Wechselwirkung der Dihydrofolatreduktase (DHFR) mit Methothrexat- oder Trimethoprim-Konjugaten (Abbildung 10B(V)) können DHFR-Fusionsproteine modifiziert werden [106]. Aber anders als bei den zuvor genannten enzymatischen Ansätzen findet hier keine kovalente Bindungsknüpfung statt. Ebenfalls nicht kovalent erfolgt die Modifikation des FK506-bindenden Proteins (FKBP12) mit verschiedenen Derivaten des synthetischen Liganden SLF (synthetischer Ligand für FKBP12). Durch die Einführung einer Punktmutation in FKBP12 (F36V) konnte ein Protein/Liganden-Paar etabliert werden, welches orthogonal zu natürlich vorkommendem FKBP12 war, was wiederum eine selektivere und weniger toxische Modifikation ermöglichte [107]. Ein letztes Beispiel einer chemoenzymatischen Reaktion beschreibt die selektive Oxidation eines konservierten Cysteins innerhalb eines Sulfatasemotivs zum Aldehyd (Abbildung 10B(VI)). Katalysiert wird diese Reaktion posttranslational durch das

Formylglycin-generierende Enzym (FGE). Durch die N- oder C-terminale Fusion des Erkennungsmotivs LCTPSR mit dem Zielprotein und anschließender Koexpression mit FGE in *E. coli*, konnten Carrico *et al.* direkt *in vivo* Proteine mit einer Aldehydfunktion generieren, und über diese bioorthogonale Gruppe anschließend weiter funktionalisieren [108].

Zusammenfassend besteht ein wichtiger Vorteil aller enzymatisch katalysierten Modifikationen in der hohen Selektivität der Reaktionspartner, was die Anwendbarkeit auch in sehr komplexen Systemen, wie auf Zelloberflächen oder in lebenden Zellen, ermöglicht. Andererseits muss eine Fusion des Zielproteins mit unter Umständen sehr großen Domänen (hAGT-Domäne ca. 25 kDa, DHFR ca. 18 kDa) in Kauf genommen werden, wodurch eine Beeinträchtigung des Zielproteins oder seiner Umgebung nicht ausgeschlossen werden kann.

2.2.2.4 Chemoselektive Modifikationen durch Chelatoren

Eine andere allgemeine semisynthetische Methode, welche ebenfalls auf einer Fusion des Zielproteins mit einer Helferpeptidsequenz angewiesen ist, basiert auf der Verwendung von chelatbildenden Reagenzien. Ein Beispiel hierfür sind die Biarsen-Reagenzien FIAsh (*Fluorescein arsenical helix binder*) oder ReAsH (*Resorufin arsenical helix binder*), welche die Fluorophore Fluorescein bzw. Resorufin enthalten [109, 110]. Durch die exakte Positionierung ihrer beiden Arsenatome können FIAsh oder ReAsH selektiv und kovalent an die vier Cysteine ihres Erkennungsmotivs CCXXCC binden und dabei ihre Fluoreszenzeigenschaften signifikant verändern (siehe Abbildung 11). Leider sind Reagenzien wie FIAsh und ReAsH nur sehr bedingt für Anwendungen *in vivo* einsetzbar, da sie toxische Nebeneffekte hervorrufen. Diese können zwar durch Zugabe von Dithiolen vermindert werden, allerdings werden dafür Konzentrationen im millimolaren Bereich benötigt.

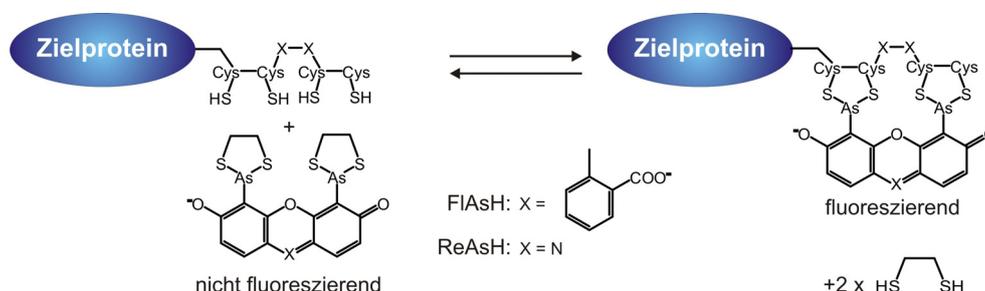


Abbildung 11. Proteinmodifikation durch FIAsh oder ReAsH. Durch die kovalente Bindung der mittels Fluorescein oder Resorufin derivatisierten Biarsenverbindung FIAsh und ReAsH können Proteine, welche genetisch mit einer Helferpeptidsequenz aus sechs Aminosäuren (CCXXCC) fusioniert sind, selektiv modifiziert werden.

Ein ähnliches chelatisierendes Prinzip wird auch zur radioaktiven Markierung von Proteinen mit ^{99m}Tc genutzt [111]. Hierfür werden Cystein- und Glycin-reiche Sequenzen, wie z.B. auch der Hexahistidin-Tag [112], als Erkennungsmotiv mit dem Zielprotein fusioniert, was bei Zugabe von TcO_4 zur Ausbildung eines sehr stabilen $[\text{TcO}]^{3+}$ Komplexes führt.

2.2.3 Rückgrat- und rekonstituierende Protein-Semisynthese

Anwendungen der im Abschnitt 2.2.2 vorgestellten semisynthetischen Methoden haben gezeigt, dass nicht-native Strukturen in funktionellen Proteinen durchaus toleriert werden können. Nichtsdestotrotz ist die spurlose Ligation über eine native Peptidbindung am Proteinrückgrat die vorteilhaftere und auch elegantere Methode zur Verknüpfung einer synthetischen und einer rekombinanten/nativen Komponente. Schließlich können nur mit einem solchen Ansatz störende Effekte minimiert und ein komplettes Protein aus Peptid- und Proteinfragmenten rekonstituiert werden. Letzteres ist z.B. für die segmentelle Isotopenmarkierung oder die selektive posttranslationale Modifikation von Proteinen von entscheidender Bedeutung. In den folgenden Kapiteln werden chemoselektive sowie chemoenzymatische Techniken zur Rückgrat- und gleichzeitig rekonstituierenden Protein-Semisynthese vorgestellt.

2.2.3.1 Die spurlose Staudinger Ligation

Die von Bertozzi *et al.* eingeführte Staudinger Ligation nutzt die Reaktion von Aziden mit Phosphanen, zwei bioorthogonale Gruppen, in wässriger Umgebung zu Phospha-Aza-Yliden. Letztere können durch eine geeignet positionierte elektrophile Falle, wie etwa eine Estergruppe, abgefangen werden, wobei eine stabile Amidbindung entsteht [113]. Bei der spurlosen Staudinger Ligation, etabliert von Bertozzi und Raines, wird zusätzlich die entstehende Phosphanoxideinheit im Hydrolyseschritt abgespalten, so dass an der Ligationstelle eine native Peptidbindung ausgebildet wird (Abbildung 12) [114]. Am häufigsten zum Einsatz kommen in diesem Zusammenhang die Phosphane Diphenylphosphanylphenol und Diphenylphosphanylmethanthiol (siehe Abbildung 12, Konstrukt 1 und 2). Anwendung bei der Rückgrat- und/oder rekonstituierenden Protein-Semisynthese fand die spurlose Staudinger Ligation bereits bei der Darstellung von RNase A aus zwei Peptid- und einem Proteinfragment [115]. Allerdings wurden hier lediglich die beiden Peptide mittels der spurlosen Staudinger Ligation verknüpft, während die kovalente Bindung zum rekombinanten Proteinfragment mit Hilfe der EPL realisiert wurde.

Abschließend sei betont, dass die Staudinger Ligation, spurlos oder nicht, natürlich auch zur Protein-Semisynthese im allgemeinen Sinn genutzt werden kann, d.h. zur Bindungsknüpfung nicht am Proteinerückgrat, sondern z.B. über die Aminosäureseitenketten von Azido-Homoalanin [79] oder über Azido-Zuckerderivate [116]. Das Feld der Staudinger Ligation und ihrer Anwendungen wurde in verschiedenen Übersichtsartikeln eingehend beschrieben [71, 117].

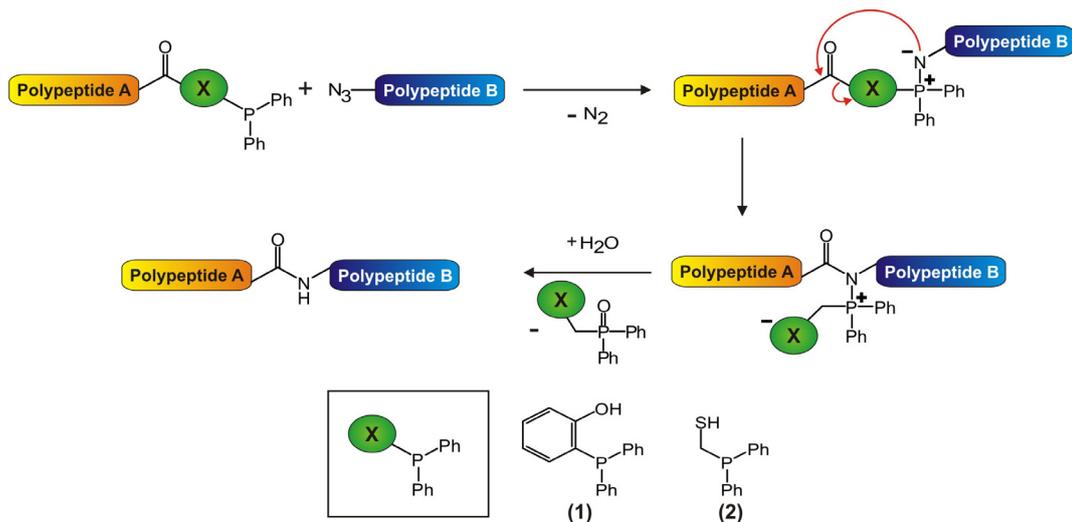


Abbildung 12. Die spurlose Staudinger Ligation. Durch die Reaktion eines N-terminalen Azids und eines C-terminalen Phosphans entsteht ein nukleophiles Aza-Ylid-Intermediat, welches durch eine positionierte (Thio)Estergruppe abgefangen werden kann. Mit Hilfe einer spaltbaren Bindung an Position X wird das Phosphanoxid von der N-substituierten Amidbindung abgespalten und es entsteht eine native Peptidbindung an der Ligationsstelle. Da es bei diesem Ansatz nicht entscheidend ist, ob Phosphan oder Azid an der synthetischen oder rekombinanten/nativen Komponente gebunden sind, sind Peptid und Protein unter dem Begriff Polypeptid A und B zusammengefasst.

2.2.3.2 Expressed Protein Ligation

Die *Expressed Protein Ligation* (EPL) basiert auf der 1994 als generelle Methode eingeführten *Native Chemical Ligation* (NCL) [118] und ist die am weitesten verbreitete und am häufigsten angewendete Ligationstechnik. Im Zentrum von EPL und NCL steht die chemoselektive Reaktion zweier Polypeptide in neutraler wässriger Lösung, von denen eines mit einer C-terminalen Thioestergruppe ausgestattet ist, und das zweite eine N-terminale Cysteinfunktion trägt. Im ersten Schritt des in Abbildung 13 gezeigten Mechanismus kommt es zu einer intermolekularen Umesterung, initiiert durch den nukleophilen Angriff der Thiolgruppe des N-terminalen Cysteins auf den reaktiven Thioester. Dieser reversiblen Reaktion folgt ein spontaner S→N-Acyltransfer (analog zu Schritt 4 im Proteinspleißen) und damit die Ausbildung der nativen Peptidbindung an der Ligationsstelle. Bemerkenswert ist,

dass zusätzliche Cysteinreste innerhalb beider Polypeptidsequenzen aufgrund der Reversibilität des ersten Reaktionsschrittes nicht stören, da nur die Reaktion des N-terminalen Cysteins den irreversiblen zweiten Schritt ausführen kann. Durch Zugabe eines Thiols zum Reaktionsmix kann aufgrund ständig ablaufender intermolekularer Umesterungen die Reaktivität des Thioesters erhöht und eine Oxidation der Thiolgruppen sowie die Ausbildung unreaktiver Disulfidbrücken verhindert werden [119].

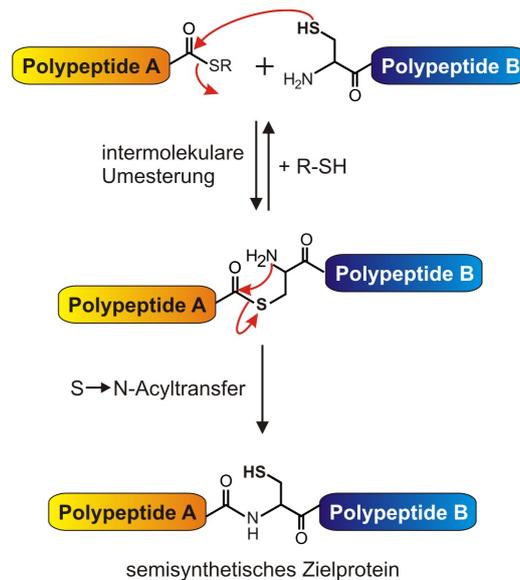


Abbildung 13. Mechanismus der Expressed Protein Ligation (EPL). Polypeptid A und B können jeweils ein rekombinantes Protein oder ein synthetisches Peptid darstellen. Durch den nucleophilen Angriff der Thiofunktion eines N-terminalen Cysteins auf den C-terminalen Thioester erfolgt eine intermolekulare Umesterung. Der anschließende irreversible S → N-Acyltransfer führt zur Ausbildung der stabilen Peptidbindung an der Ligationstelle.

Während bei der NCL zwei ungeschützte, durch Festphasenpeptidsynthese (SPPS) generierte Polypeptide unter Ausbildung einer nativen Peptidbindung miteinander reagieren, stellt die EPL die Erweiterung des Systems auch auf rekombinant generierte Proteine dar. Hierbei sind beide möglichen Kombinationen umsetzbar, d.h die Ligation eines N-terminalen Proteins mit einer C-terminalen Peptidsequenz [25, 120, 121] genauso wie die umgekehrte Anordnung [122]. Die Etablierung der ersten Variante wurde in der Literatur fast zeitgleich von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen beschrieben, wobei sowohl die Bezeichnung *Expressed Protein Ligation* (EPL) [120, 121] als auch der Name *Intein-Mediated Protein Ligation* (IPL) [25] eingeführt wurden. Da allerdings der Name IPL irreführend darauf hindeutet, dass ein Intein direkt an der Ligation von Peptid und Protein beteiligt ist, wird in dieser Arbeit, genauso wie in einem bereits zuvor veröffentlichten Übersichtsartikel [5], auf diesen Ausdruck verzichtet. Stattdessen wird ausschließlich der

Begriff *Expressed Protein Ligation* für die semisynthetische Version der NCL verwendet, wobei sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Reaktionskomponente rekombinant sein können. Natürlich ist auch die Ligation zweier rekombinanter Proteine oder Proteinfragmente möglich, was für Anwendungen wie die segmentelle Isotopenmarkierung von besonderem Interesse ist [123, 124]. Auch die Konjugation von drei oder mehr Fragmenten wurde bereits realisiert und erlaubt den Einbau synthetischer Bausteine auch in interne Bereiche eines Proteins [125]. Die sequentielle Polypeptidligation kann mit Hilfe eines reversibel geschützten Cysteins vom C- zum N-Terminus verlaufen [126], oder aber in umgekehrter Richtung auf eine kinetisch kontrollierte Weise durch Verwendung verschieden reaktiver Thioestergruppen (Thioarylester reagieren schneller als Thioalkylester) [127].

Zur Durchführung einer Protein-Semisynthese mittels EPL müssen Peptide und/oder Proteine mit einer C-terminalen Thioestergruppe genauso wie mit einer N-terminalen Cysteinfunktion generiert werden. Eine Übersicht der bis heute für diesen Zweck etablierten Methoden ist in einem Review-Artikel von Muralidharan und Muir beschrieben [13]. Die Freisetzung von Proteinen mit N-terminalem Cystein kann entweder durch Proteolyse (TEV-Protease, Faktor Xa-Protease oder Methioninaminopeptidase) oder mittels modifizierter Inteine und induzierter C-terminaler Spaltung durchgeführt werden. Die Darstellung eines Zielproteins mit C-terminalem Thioester gelingt durch Thiolyse eines Fusionsproteins aus Zielprotein und modifiziertem Intein mit Thiolen wie Thiophenol oder Mercaptoethansulfonsäure Natriumsalz (MESNA). Peptide mit N-terminaler Cysteinfunktion durch Festphasenpeptidsynthese (SPPS) zu synthetisieren stellt kein Problem dar, während die Synthese einer C-terminaler Thioesterfunktion durchaus problematisch sein kann. Die Methode der Wahl hierfür ist die *tert*-Butoxycarbonyl-basierte (Boc) SPPS, da hier alle Reaktionsschritte unter Thioester-kompatiblen sauren Bedingungen erfolgen. Allerdings birgt die Boc-Chemie den Nachteil der finalen Harzabspaltung mittels der extrem ätzenden und gefährlichen Fluorwasserstoffsäure. Außerdem können mit diesem Ansatz einige speziell modifizierte Peptide nicht synthetisiert werden, wie z.B. Phospho- oder Glykopeptide. Bei der Fluorenylmethoxy-basierten (Fmoc) SPPS werden Thioestergruppen bereits während der Synthese aufgrund basischer Entschützungsbedingungen (40% Piperidin) durch Aminolyse gespalten. Nur die Einführung spezieller Linkergruppen zwischen Peptid und Harz (für Übersicht siehe [13]) erlaubt z.B. eine Thioesterbildung am geschützten Peptid nach Harzabspaltung in Lösung. Allerdings treten auch mit diesen Linkergruppen häufig Probleme wie Hydrolyse des Thioesters oder Racemisierung der C-terminalen Aminosäurefunktion auf.

Eine wichtige Voraussetzung der EPL oder NCL ist die Präsenz einer Cysteinaminosäure an der Ligationsstelle, was aber bei verschiedenen Anwendungsbeispielen nicht erfüllt werden kann. Darum wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Ansätze entwickelt, um ein solches Cystein entweder nach der Ligation in eine andere Aminosäure umzuwandeln (Desulfurisierung zu Alanin [128]), um eine alternative Aminosäure zu verwenden (Homocystein-, Selenocystein- oder Methionin-basierte Ligation [129, 130]), oder um mit entfernbaren Thiol-Hilfsgruppen (Auxiliare) zu ligieren [131, 132].

2.2.3.3 Die reverse Proteolyse

Die stringenteren Arten der Protein-Semisynthese können auch mit Hilfe von Enzymen betrieben werden, welche das Proteinrückgrat spalten und/oder Peptidbindungen knüpfen. Ein erstes Beispiel hierfür stellt die reverse Proteolyse mit Hilfe verschiedener Serin- oder Cysteinproteasen dar. So kann z.B. durch gezielte Mutationen innerhalb der Serin-Protease Subtilisin (neuer Name „Subtiligase“) die Aminolysereaktion im Vergleich zur Hydrolyse gesteigert werden. Well und Mitarbeiter konnten auf diese Art erfolgreich das komplette Protein RNase A aus 6 Peptidfragmenten aufbauen [133].

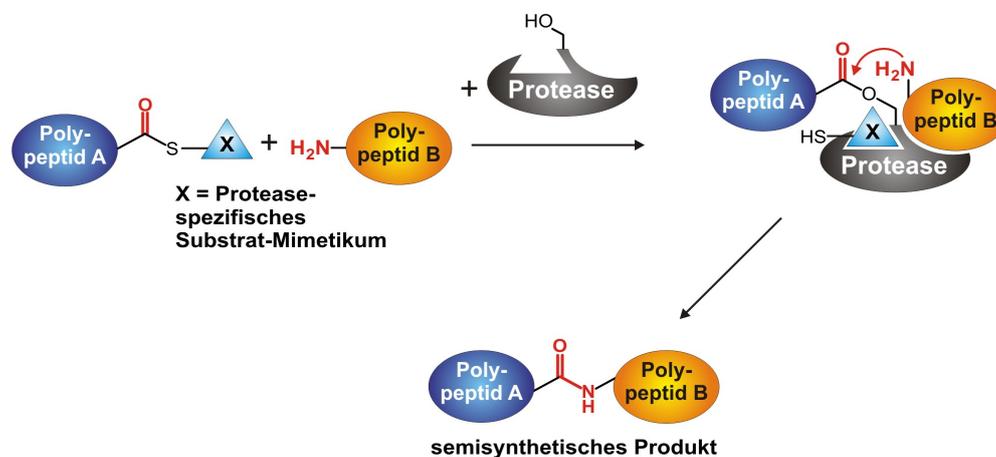


Abbildung 14. Reverse Proteolyse. Bei der reversen Proteolyse wird eine im Vergleich zur Hydrolyse gesteigerte Aminolysereaktion von Cystein- oder Serin-Proteasen genutzt. Dabei kann ein Peptid oder Protein (Polypeptid A), welches eine C-terminale Thioesterfunktion mit einer Protease-spezifischen Abgangsgruppe (X) enthält, mit einem anderen Peptid oder Protein (Polypeptid B) über eine native Peptidbindung verknüpft werden.

Eine Kombination der reversen Proteolyse mit der *Expressed Protein Ligation* (*Expressed Enzymatic Ligation* (EEL)) nutzten Beck-Sickinger und Mitarbeiter zur Protein-Semisynthese des Prohormons von Neuropeptid Y [134]. Durch die Fusionierung des Zielproteins mit einem modifizierten Intein und anschließender Thiolyse mit dem

entsprechenden Thiol kann ein C-terminaler Thioester am Zielprotein generiert werden, welcher ein Substrat-Mimetikum der jeweiligen verwendeten Protease darstellt (siehe Abbildung 14). Dieses Mimetikum wird von der Serinprotease erkannt, woraufhin das Polypeptid A über eine Esterbindung kovalent mit dem katalytischen Serin der Protease verknüpft wird. Anschließend erfolgt die Ligation mit einer N-terminalen Aminogruppe unter Ausbildung der nativen Peptidbindung. Damit ist die Ligation zweier Fragmente, synthetischen oder rekombinanten Ursprungs, unabhängig von den Aminosäuren an der Ligationsstelle möglich.

2.2.3.4 Die Sortase-vermittelte Ligation

Ein anderes Protein, welches Reaktionen am Peptidrückgrat von Proteinen katalysiert, ist die Sortase aus *Staphylococcus aureus*. Sie repräsentiert eine Transpeptidase, die Proteine mit dem C-terminalen Aminosäuremotiv LPXTG kovalent mit der Zellwand verknüpft. Durch die Spaltung der Peptidbindung zwischen Threonin und Glycin innerhalb des Erkennungsmotivs und die gleichzeitige Übertragung des verkürzten Motivs auf einen konservierten Cysteinrest der Sortase in Form einer Thioesterbindung, kann das Protein schließlich über eine neue Peptidbindung mit der Pentaglycinsequenz des Peptidoglykangerüsts verknüpft werden (Abbildung 15).

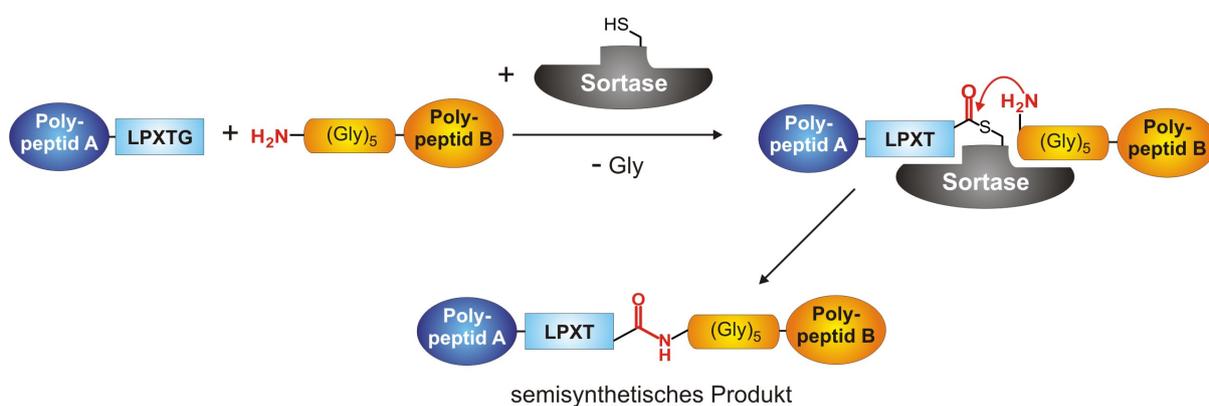


Abbildung 15. Sortase-vermittelte Ligation. Mit Hilfe der Sortase kann ein Zielprotein oder Zielpeptid (Polypeptid A) mit C-terminaler Erkennungssequenz (LPXTG) zunächst über einer Thioesterbindung an die Sortase selbst, und anschließend über eine native Peptidbindung an ein Peptid oder Protein mit einer Polyglycin-Sequenz (Polypeptid B) ligiert werden. Die Aminosäuren an der Ligationstelle sind in diesem Fall durch das Erkennungsmotiv und die Polyglycin-Sequenz festgelegt.

Pollok und Mitarbeiter konnten durch Verwendung verschiedener Peptide oder Proteine mit fünf N-terminalen Glycinresten diese selektiv mit Peptid-LPXTG- oder Protein-LPXTG-Konstrukten verknüpfen [135]. Popp *et al.* gelang die Sortase-vermittelte

Modifikation von Proteinen direkt auf der Zelloberfläche [136]. Allerdings bleibt festzuhalten, dass in diesem Beispiel einer chemoenzymatischen Reaktion immer mehrere Aminosäuren an der Ligationstelle essentiell sind, welche dann auch im Ligationprodukt verbleiben.

2.2.3.5 Das semisynthetische *trans*-Proteinspleißen

Wenn es um die Knüpfung einer nativen Peptidbindung zwischen einem synthetischen Peptid und einem rekombinanten Protein geht, stellt das semisynthetische *trans*-Proteinspleißen eine wichtige Alternative zur *Expressed Protein Ligation* dar. Formell werden hierbei die beiden reaktiven Gruppen der EPL (C-terminaler Thioester und N-terminales Cystein) durch zwei Inteinfragmente (Int^{N} und Int^{C}) ersetzt. Für die Durchführung einer semisynthetischen Spleißreaktion muss ein Fusionskonstrukt aus Extein und Inteinfragment synthetisch und ein zweites rekombinant generiert werden, wodurch sich der semisynthetische Charakter nicht nur auf das gewünschte Spleißprodukt, sondern auch auf das eingesetzte Intein bezieht (Abbildung 16). Nach der Assoziation beider Inteinfragmente und der Rekonstitution des aktiven Inteins, wird der Mechanismus des Proteinspleißens, wie in Abbildung 3 dargestellt, durchlaufen. Die Fragmentgrößen der bekannten gespaltenen Inteine liegen in Bereichen von ca. 100 Aminosäuren für das N-terminale Fragment und 35-50 Aminosäuren für das C-terminale Fragment (siehe Abschnitt 2.1.2). Da die obere Grenze der mittels Festphasenpeptidsynthese darstellbaren Peptide bei einer Länge von ca. 50 Aminosäuren liegt [68], war ein semisynthetischer Ansatz bislang lediglich auf das C-terminale Inteinsegment und damit auf eine C-terminale Modifikation von Zielproteinen beschränkt.

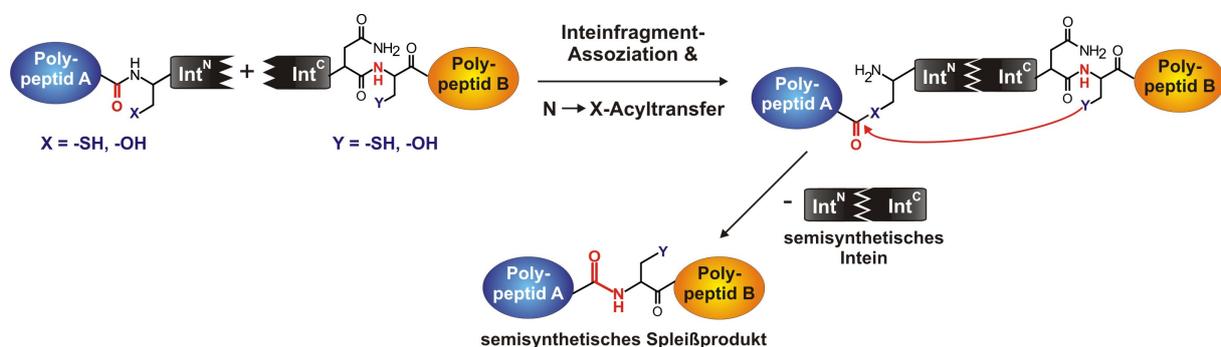


Abbildung 16. Semisynthetisches *trans*-Proteinspleißen. Beim semisynthetischen *trans*-Proteinspleißen werden mit Hilfe eines gespaltenen Inteins zwei Polypeptide (A und B), welche in Fusion mit Int^{N} bzw. Int^{C} synthetischen oder rekombinanten Ursprungs sein können, über eine native Peptidbindung miteinander verknüpft. Dabei ist eine Aminosäurefunktion mit nukleophiler Seitenkette an der Ligationposition essentiell. Bislang konnte aufgrund der Größe der Inteinfragmente lediglich die Fusion aus Int^{C} und Polypeptid B synthetisch generiert werden.

Zwei verschiedene semisynthetische Inteine wurden bis zum Beginn dieser Arbeit in der Literatur bereits beschrieben (siehe auch Kapitel 6.1.1). Für das nativ gespaltene *Ssp* DnaE-Intein konnte die aus 36 Aminosäuren bestehende C-terminale Inteinhälfte in Fusion mit wenigen C-Exteinaminosäuren mittels SPPS synthetisiert, und anschließend eine Spleißreaktion unter physiologischen Bedingungen *in vitro* durchgeführt werden [36, 137, 138]. Giriat und Muir nutzten das gleiche Intein zur Darstellung semisynthetischer Proteine in Säugetierzellen [73]. Auch das *Mtu* RecA-Intein wurde bereits zur Protein-Semisynthese eingesetzt [139, 140]. Das synthetische Int^C-Fragment bestand in diesem Fall minimal aus 35 Aminosäuren, was die Problematik bisheriger Ansätze verdeutlicht: Alle C-terminalen Inteinfragmente bewegen sich nahe am Größenlimit der durch Festphasenpeptidsynthese zugänglichen Peptide, was die Synthese einerseits sehr aufwendig macht, andererseits den Spielraum bei Auswahl und Größe der C-Exteinsequenzen stark einschränkt. Ein N-terminales Inteinfragment konnte bis zu Beginn dieser Arbeit chemisch nicht synthetisiert werden, da alle bekannten Fragmente das Größenlimit überschritten.

2.3 Aufgabenstellung

Die Darstellung von semisynthetischen Proteinen, welche aus einer rekombinanten/nativen und einer synthetischen Komponente aufgebaut sind, erlaubt den chemo- und regioselektiven Einbau verschiedenster Modifikationen und chemischer Reportergruppen in Zielproteine ohne Größenlimitation. Von ganz besonderem Interesse sind solche semisynthetischen Methoden, bei denen ein Peptid und ein Protein über eine native Peptidbindung miteinander fusioniert werden. Auf diese Weise können beide Komponenten „spurlos“ miteinander verknüpft werden. Für eine solche Aufgabe sind einige wenige chemoselektive und chemoenzymatische Techniken bereits bekannt. Hierbei stellt das semisynthetische *trans*-Proteinspleißen einen vielversprechenden Ansatz dar, da es die selektive Ligation eines Peptids mit einem Protein unter physiologischen Bedingungen und bei niedrigen mikromolaren Reaktantenkonzentrationen auch in sehr komplexen Umgebungen erlaubt [73, 137, 139]. Der entscheidende Grund, warum die Protein-Semisynthese mittels gespaltener Inteine bislang nur vereinzelt Anwendung gefunden hat, liegt in der durch Festphasenpeptidsynthese nur sehr aufwendigen Zugänglichkeit der C-terminalen Inteinfragmente (35-50 AS), während N-terminale Fragmente überhaupt noch nicht synthetisiert werden konnten (über 100 AS). In einer systematischen Untersuchung verschiedener Spaltungspositionen im *Ssp* DnaB-Intein konnte 2004 erstmals ein neues gespaltenes Intein mit einem sehr kleinen N-terminalen Fragment identifiziert werden, welches *in vivo* spleißaktiv war [67].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das letztgenannte künstlich gespaltene *Ssp* DnaB-Intein erstmals semisynthetisch eingesetzt werden. Durch eine rekombinante Expression der C-terminalen Inteinhälfte, und durch die Festphasenpeptidsynthese des N-terminalen Inteinfragments sollte die Spleißaktivität des Inteins *in vitro* getestet, charakterisiert und optimiert werden. Weiterhin sollte dieser Ansatz als generelle Methode zur N-terminalen Modifikation verschiedener Zielprotein etabliert und die volle enzymatische Aktivität der semisynthetischen Spleißprodukte verifiziert werden. Da bei diesem Ansatz nicht nur das Spleißprodukt, sondern auch das rekonstituierte Intein semisynthetischer Natur sind, sollten weiterhin verschiedene natürliche und unnatürliche Modifikationen innerhalb der Int^N-Sequenz eingeführt, und damit Fragestellungen zur Assoziation und Wechselwirkung der Inteinfragmente sowie zum Spleißmechanismus untersucht werden.

3 Materialien

3.1 Geräte

Tabelle 3. Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Typ
Agarosegel-Apparatur	PEQLAB	Perfect Blue Gelsystem
Analysenwaagen	Mettler Sartorius	PM400 Basic
Autoklav	Thermo Fisher Scientific	Varioklav 135 S
Digitalkamera	Canon	PowerShot G5
Elektroporator	Biorad	MicroPulser
Emulsifier	Avestin	Emulsiflex-C5
ESI-MS	Applied Biosystemst	QStar Pulsar i Time-Of-Flight
ESI-MS/MS und MS ³	Thermo Fisher Scientific	LTQ-Massenspektrometer
Fluoreszenz-Spektrometer	Tecan	Safire II
FPLC-System	GE Healthcare	ÄKTA prime plus
Gefrierschrank -80°C	New Brunswick Scientific	ultra low temperature freezer
Gefriertrockner	Christ	LT-105
Heizblock	Eppendorf	ThermoStat plus
HPLC (analytisch)	Agilent	1100 Serie mit der Säule - Zorbax 300SB-C8 - Eclipse XDB-C18 3,5 µM - Zorbrax 300SB-C3
HPLC (präparativ)	Varian	Prostar Serie mit der Säule - Microsorb 300-5 C18
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific Infors	I26, TC-7 HT Aerotron
MALDI-TOF	Bruker Daltonics	Autoflex II
Mikrowelle	Sharp	R-933
Netzgerät	Biorad	PowerPac Basic
PCR-Thermozyler	Biometra	Tpersonal
Peptidsynthesizer	Multisyntech	Syro XP
pH-Meter	Hanna Instruments	pH 211
Pipetten	Eppendorf	Research
Reinstwasseranlage	Millipore	Milli-Q
Rotoren	Sorvall FiberLite	SS-34 F8
SDS-Vertikalkammer	BioRad	Mini-PROTEAN
Taumler	Heidolph	Polymax 1040
Ultraschallbad	Bandelin	Sonorex Digitec
UV-Schirm	H. Saur	Transilluminator IL-200-M
UV/VIS-Spektrometer	Amersham Bioscience	Ultrospec 3100 pro
Vakuumpumpe	KNF Neuberger	Laboport SR
Vortexer	Harmony	VTX-3000L
Zentrifugen	Eppendorf Eppendorf Sorvall	5415 R 5702 R Evolution RC

2.2 Enzyme und Chemikalien

Alle nachfolgend nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Novabiochem (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) in *p.a.* Qualität bezogen.

Tabelle 4. Enzyme und Chemikalien

Hersteller	Produkt(e)
<i>Acros Organics</i> (New Jersey, USA)	N-Methylmorpholin, Imidazol
<i>AppliChem</i> (Darmstadt, Deutschland)	IPTG, Ampicillin, Kanamycin, Tris, Trypton, HCl, Isopropanol
<i>Biosolve</i> (Valkenswaard, Niederlande)	DMF
<i>Calbiochem</i> (Darmstadt, Deutschland)	Nitrocefin
<i>Deutsche Hefewerke</i> (Nürnberg, Deutschland)	Hefeextrakt
<i>Eurogentec</i> (Köln, Deutschland)	Agarose
<i>Fermentas</i> (St. Leon-Rot, Deutschland)	Restriktionsenzyme und -puffer, DTT, Protein-Marker
<i>Fluka</i> (Neu Ulm, Deutschland)	Phenol, Mercaptoethanol, 5,6-Carboxyfluorescein, TCEP
<i>GE Healthcare</i> (München, Deutschland)	ECL Westernblotting System, Ni-Sepharose 6 fast flow, HiTrap Q HP Säulen
<i>Halocarbon</i> (New Jersey, USA)	TFA
<i>IBA</i> (Göttingen, Deutschland)	Streptactin-Sepharose, Desthiobiotin
<i>KNF optichem</i> (Lohmar, Deutschland)	Ethanol, Acetonitril
<i>Macherey & Nagel</i> (Düren, Deutschland)	porablot NCP 0,45 µm Nitrocellulosemembran
<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)	SDS, <i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Tween-20, MESNA, 5-IAF
<i>Millipore</i> (Carrigtwohill, Irland)	Viva-Spin-Säulen (MWCO: 5, 10, 30 und 50 kDa), Dialysemembran (Porendurchmesser 0,025 µm)
<i>MultiSynTech</i> (Witten, Deutschland)	HBTU
<i>Novabiochem</i> (Darmstadt, Deutschland)	Fmoc-geschützte Aminosäurebausteine, Harze
<i>Novagen</i> (Darmstadt, Deutschland)	KOD-Hot Start Polymerase-PCR-Kit
<i>New England Biolabs</i> (Schwalbach, Deutschland)	DNA-Marker, BSA
<i>Operon Biotechnologies</i> (Köln, Deutschland)	Oligonukleotide
<i>Qiagen</i> (Hilden, Deutschland)	Plasmidpräparationskit QIAquick Spin Säule, Ni ²⁺ -NTA-Superflow, QIAquick Gel Extraction Kit
<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)	Acrylamid-Lsg. Rotiphorese-Gel 30 für SDS-PAGE, Agar, APS, Dialyseschlauch (MWCO: 15 kDa), Ethidiumbromid, TEMED, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau
<i>Sigma-Aldrich</i> (München, Deutschland)	Trypsin, Insulin, Ethandithiol, Thioanisol, Piperidin, DIPEA, ¹⁸ O-Wasser 97% (<i>ISOTEC</i>)

3.3 Vektoren

3.3.1 pSU38

Der pSU38-Vektor (2685 bp) wurde auf der Grundlage des Plasmids pACYC184 von Bartholome *et al.* konstruiert [141]. Der Vektor liegt durch das P15A-Replikon in einer niedrigen Kopienzahl (20-30) innerhalb der Zelle vor. Außerdem enthält das Plasmid das Kanamycin-Resistenzgen, einen *lac*-Promotor und das *lacZ* α -Reporterogen.

3.3.2 pMAL-c2X

Der Vektor pMAL-c2X (6646 bp) der Firma *New England Biolabs (NEB)* dient zur Herstellung von Fusionsproteinen, welche aus dem Maltose-bindenden Protein (MBP) aus *E. coli* (N-terminal) und dem Zielprotein aufgebaut sind. Die Expression dieses Gens wird vom *tac*-Promoter reguliert. Die Aufreinigung des finalen Fusionsproteins kann mit Hilfe einer Amylose-basierten Affinitätschromatographie durchgeführt werden. Das ebenfalls in diesem Plasmid kodierte *lacI*-Gen (*lac*-Repressor) ermöglicht eine Induktion der Genexpression mit Isopropylthiogalaktosid (IPTG). Das eine Resistenz gegen Ampicillin verleihende β -Lactamasegen, sowie der Replikationsursprung *ColE1* stammen aus pBR322. Der Replikationsursprung M13 stammt aus pZ150.

3.3.3 pQE60

Der pQE60-Vektor (3431 bp) der Firma *Qiagen* besitzt einen *E. coli* T5-Phagen-Promotor, zwei *lac*-Operator-Erkennungssequenzen, sowie eine für *E. coli* optimierte synthetische ribosomale Bindungsstelle RBSII. Die Ligation eines Gens in die MCS führt zur Produktion eines Fusionsproteins mit C-terminalen His₆-Tag, welches mit Hilfe der Ni²⁺-NTA-Chromatographie gereinigt werden kann. Durch die Expression des Ampicillin-Resistenzgens (*bla*) vermittelt der pQE60-Vektor eine Resistenz gegen Ampicillin. Der Replikationsursprung *ColE1* stammt aus pBR322.

3.3.4 pET16b

Der pET16b-Vektor (5711 bp) der Firma *Novagen* verfügt über eine N-terminale His₆-Tag-Sequenz mit anschließender Faktor Xa Protease-Schnittstelle. Die Expression des Zielgens wird durch einen T7-Promotor reguliert und das *lacI*-Gen reprimiert eine Genexpression bis zur Zugabe von IPTG. Die Reinigung des Zielproteins kann mit Hilfe der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie erfolgen. Das Plasmid vermittelt durch das *bla*-Gen eine

Ampicillin-Resistenz und die Vervielfältigung geschieht über den ColE1 Replikationsursprung aus pBR322.

3.3.5 pET22b

Der pET22b-Vektor (5493 bp) der Firma *Novagen* trägt eine N-terminale pelB-Signalsequenz, welche es ermöglicht Zielproteine ins Periplasma zu transportieren. Außerdem verleiht der Vektor dem Zielprotein eine C-terminale His₆-Tag-Sequenz, was eine Proteinreinigung mittels der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie ermöglicht. Weiterhin sind das Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) und der *lac*-Repressor (*lacI*) auf dem Plasmid codiert. Bei dem Promotor dieses Vektors handelt es sich um den T7-Promotor, der Replikationsursprung ColE1 stammt aus pBR322.

3.3.6 pET28a

Der pET28a-Vektor (5369 bp) der Firma *Novagen* trägt eine N-terminale His₆-Tag-Sequenz mit anschließender Thrombin Protease-Schnittstelle, sowie einen C-terminalen His₆-Tag. Damit können die Zielproteine dieses Vektors über eine Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Außerdem enthält der Vektor das Kanamycin-Resistenzgen, einen T7-Promotor, den *lac*-Repressor (*lacI*) und den Replikationsursprung ColE1 aus pBR322.

3.4 Mikroorganismen

Tabelle 5. Verwendete Mikroorganismen

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal endA</i> λ(DE3) Hte
<i>E. coli</i> Top 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL</i> (Str ^R) <i>endA</i> λ ⁻
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ <i>endA glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>endA gyrA96</i> (nal ^R) <i>thi-1 recA1 relA1 lac glnV44</i> F'[::Tn10 <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>)M15] <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺)

3.5 Medien

Als Vollmedium zur Anzucht von *E. coli*-Kulturen wurde Luri-Bertani-(LB)-Medium verwendet. Zur Sterilisation wurden alle Medien vor dem Gebrauch für 20 Minuten bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert.

LB-Medium: 10 g/L Bactotrypton
 5 g/L Hefeextrakt
 5 g/L NaCl
 pH 7,0

Hitzeempfindliche Substanzen, wie z.B. Antibiotika, wurden dem Medium als sterilfiltrierte Lösungen erst nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von ca. 50°C in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Ampicillin: 100 µg/mL
Kanamycin: 50 µg/mL

Zur Herstellung von Agarplatten wurde das Medium vor dem Autoklavieren mit 1,5% (w/v) Agar Nr. 1 versetzt.

3.6 Puffer und Lösungen

Amylose-Puffer A 20 mM Tris
 200 mM NaCl
 1 mM EDTA
 pH 7,4

Amylose-Puffer B 20 mM Tris
 200 mM NaCl
 1 mM EDTA
 10 mM Maltose
 pH 7,4

Anionenaustausch-Puffer A : 50 mM Tris
 2 mM EDTA
 pH 8,0

Anionenaustausch-Puffer B:	50 mM Tris 500 mM NaCl 2 mM EDTA pH 8,0
Coomassie-Entfärbelösung:	40% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure in ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung:	40% (v/v) Ethanol 10% Essigsäure 2,5 g/L Coomassie Brilliant Blau R 250 in ddH ₂ O
6xDNA-Probenpuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol 15% (w/v) Ficoll-400 in ddH ₂ O
HPLC-Puffer A:	0,05% (v/v) TFA in ddH ₂ O
HPLC-Puffer B:	0,05% (v/v) TFA in Acetonitril
Ni ²⁺ -NTA-Puffer A:	50 mM Tris 300 mM NaCl pH 8,0
Ni ²⁺ -NTA-Puffer B:	50 mM Tris 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 8,0
Reagent K:	750 mg Phenol (5%) 500 µL Thioanisol (5%) 250 µL Ethandithiol (2,5%) 500 µL ddH ₂ O (5%) in 10 mL TFA (82,5%)
SDS-Gel-Laufpuffer:	50 mM Tris 250 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
4xSDS-Probenpuffer:	50 mM Tris/HCl 8% (w/v) SDS 40% (v/v) Glycerin 20% (v/v) β-Mercaptoethanol 0,2% (w/v) Bromphenolblau pH 6,8

Spleißpuffer:	50 mM Tris 300 mM NaCl 1 mM EDTA 2 mM DTT 10% – 20% (v/v) Glycerin pH 7,0
Strep-Tag-Puffer A:	100 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8,0
Strep-Tag-Puffer B:	100 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA 2,5 mM Desthiobiotin pH 8,0

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Techniken

Alle die in dieser Arbeit angewendeten molekularbiologischen Techniken wurden nach Standardvorschriften durchgeführt [142]. Diese Methoden umfassen: die Plasmidpräparation aus *E. coli* durch alkalischen Zellaufschluss [143], die DNA-Vervielfältigung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) [144], die Punktmutations-PCR nach dem *QuickChange SiteDirected Mutagenesis*-Protokoll der Firma *Stratagene* [145], die DNA-Fragment- und Plasmidreinigung mit Hilfe der *QIAquick-spin-Säulen* der Firma *Qiagen*, die Ligation von DNA-Fragmenten durch die T4-DNA-Ligase, sowie die abschließende Sequenzierung des hergestellten Plasmidkonstrukts bei der Firma *GATC Biotech AG* (Konstanz). Eine detaillierte Beschreibungen dieser Methoden befindet sich außerdem in der angegebenen Diplomarbeit [146].

4.1.1 Konstruktion der Expressionsplasmide

Die Herstellung der verwendeten Expressionsplasmide ist nachfolgend in nummerierter Reihenfolge aufgelistet. Hierbei sind eingeführte Restriktionsschnittstellen unterstrichen dargestellt, während im Fall einer Punktmutations-PCR die durch die Primer eingeführten mutierten Nucleinsäure-Basen fett gedruckt sind. Eine tabellarische Übersicht aller verwendeter Konstrukte (Tabelle 13) und genutzter Primer (Tabelle 14) befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

Konstrukt 1, Strep-Trx-Int^N(1-12)-R (pCL14): Das für Thioredoxin codierende Genfragment wurde mittels der Primer 5'-ATACCATGGCCGCCTTGAGCCACCCGCAGTTCGAAAA GGATCTGATAAAATTATTCATC-3' (oHM106) und 5'-ATAGAATTCAGAGCCGGCCA GGTTAGCG-3' (oHM107) und dem als Templat dienenden Vektor pBAD202 (*Invitrogen*) amplifiziert. Der Primer oHM106 führte gleichzeitig den N-terminalen Strep-Tag II ein. Dieses Genfragment wurde schließlich mittels der Restriktionsschnittstellen *NcoI* and *EcoRI* in das mit den gleichen Enzymen verdaute Plasmid pCL13 (siehe unten) eingefügt, was zum finalen Plasmid pCL14 führte.

Konstrukt 1a, Strep-Trx-Int^N(1-12, C1A)-R (pCL27): pCL14 diente als Templat-DNA in der Punktmutations-PCR mit den Primern 5'-TCTGAATTCTCCGGCGCCATCAGTGGAGAT

AG-3' (oCL34) und 5'-CTATCTCCACTGATGGCGCCGGAGAATTCAGA-3' (oCL34-r), in der die Punktmutation Cys1Ala in das neue Plasmid pCL27 eingeführt wurde. Gleichzeitig wurde auch eine neue *HaeII*-Restriktionsschnittstelle eingebracht.

Konstrukt 2, Int^C(12-154)-His₆ (pCL11): Das Int^C(12-154)-Fragment wurde von dem Plasmid pMST [18], welches das komplette *Ssp* DnaB-Mini-Intein kodierte, mit den Oligonukleotiden 5'-ATACCCATGGGCACTAGTAGCACAGGAAAAAGAGTTTC-3' (oHM130) und 5'-ATAGGTACCGGATCCTTCAATACTGTTATGGACAATGATG-3' (oHM131) amplifiziert. Anschließend gelang die Insertion in ein pET16b-Derivat, welches das *Bam*HI-*Hind*III-Fragment des pQE60-Vektors (*Qiagen*) inklusive des His₆-Tags enthielt. Aus diesem Zwischenprodukt wurde durch eine Restriktion mit *Sph*I und *Eco*RI ein Fragment herausgeschnitten, welches neben der Int^C(12-154)-His₆-Sequenz auch den T7-Promoter enthielt. Die Ligation dieses Fragments mit dem ebenfalls *Sph*I-*Eco*RI-verdauten pSU38-Vektor führte zum Zielplasmid pCL11.

Konstrukt 7, Int^C(12-154)-Trx-His₆ (pCL20): Das Thioredoxin-Fragment dieses Plasmids wurde von dem Vektor pBAD202 mit Hilfe der Oligonukleotide 5'-ATAGGATCCGGAGGAGGATCTGATAAAATTATTCATC-3' (oCL31) und 5'-TATGATCCAGAGCCGGCCAGGTTAGCG-3' (oCL32) amplifiziert und in die *Bam*HI-Schnittstelle des Plasmids pCL11 ligiert. Dies führte zu Plasmid pCL20.

Konstrukt 7a, Int^C(12-154)-Trx(S[+1]A)-His₆ (pCL28): pCL20 diente als DNA-Templat für die Punktmutations-PCR mit den Oligonukleotiden 5'-GACATCATTGTCCATAACGCGATCGAAAGGATCCGGAGGAGG-3' (oCL35) und 5'-CCTCCTCCGATCCTTCGATCGCGTTATGGACAATGATGTC-3' (oCL35-r). Auf diese Weise konnte die Ser[+1]Ala-Mutation innerhalb des Trx-Genfragments eingeführt (neue Schnittstelle *Pvu*I) und das Plasmid pCL28 erhalten werden.

Konstrukt 7b, Int^C(12-154, N154A)-Trx(S[+1]A)-His₆ (pMP06): Die Einführung der Punktmutation N154A gelang mit Hilfe einer Punktmutations-PCR mit dem DNA-Templat pCL28 und den Primern 5'-CCAATGACATCATTGTGCATGCCGCGATCGAAGGAGGA-3' (oMP03) und 5'-TCCTCCTTCGATCGCGGCATGCACAATGATGTCATTGG-3' (oMP03-r). Das hierbei erhaltene Expressionsplasmid pMP06 enthielt eine neue *Sph*I-Schnittstelle.

NdeI und *HindIII* gelang der Einbau des Zielgens in den pET22b-Vektor, und damit die Erzeugung von Plasmid pCL65.

Konstrukt 18, Int^C(2-154)-βLac-His₆ (pCL50): Durch die Verwendung der Primer 5'-ATACCATGGGCATCAGTGGAGATAGTTTGATC-3' (oCL47) und 5'-ATAGGTACCGGATCCTTCAATACTGTTATGGACAATGATG-3' (oHM131) konnte das Int^C(2-154)-Fragment vom Templat-Plasmid pMST [18] vervielfältigt werden. Die eingeführten Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BamHI* ermöglichten schließlich den Austausch dieser amplifizierten Gensequenz gegen das Int^C(6-154)-Gensegments in Plasmid pCL44. Dies führte zum gewünschten Expressionsplasmid pCL50.

Konstrukt 19, Int^C(12-429)-Trx-His₆ (pCL38): Um das Int^C-Fragment inklusive der im nativen *Ssp* DnaB-Maxi-Intein insertierten Endonuklease zu amplifizieren (AS 12-429), wurde eine PCR mit den Primern 5'-ATACCATGGGCACTAGTAGCACAGGAAAAAGAGTTTC-3' (oHM130) und 5'-ATAGGTACCGGATCCTTCAATACTGTTATGGACAATGATG-3' (oHM131) durchgeführt, bei der die chromosomale DNA des Cyanobakteriums *Synechocystis sp.* PCC6803 als Templat diente. Die Ligation in den pET16b-Vektor gelang mittels der Restriktion mit *NcoI* und *BamHI*. Das Thioredoxin-Genfragment wurde anschließend, genauso wie bei der Klonierung von pCL20 bereits beschrieben, in die *BamHI*-Restriktionsschnittstelle ligiert, was zum Zielplasmid pCL38 führte.

Konstrukt 20, MBP-Int^N(1-104, C50S)-His₆ (pNB05): Das Plasmid pSB13 (MBP-Int^N(1-104)-FKBP-His, siehe [55]) diente als Templat in einer Punktmutations-PCR mit den Primern 5'-GTTAGTCGTGTATTTAGTACTGGCAAAAAGC-3' (oHM138) und 5'-GCTTTTTGCCAGTACTAAATACACGACTAAC-3' (oHM139) zur Einführung der C50S-Mutation. Das FKBP-kodierende Fragment wurde durch Restriktion mit *XbaI* und *SpeI* und durch eine anschließende Religation entfernt. Abschließend wurde das durch *NcoI/HindIII*-Restriktion erhaltene Fragment in den pET28a-Vektor (*Novagen*) überführt, was das gewünschte Plasmid pNB05 lieferte.

Konstrukt 21, MBP(G[-1]A)-Int^N(1-104, C50S)-His₆ (pCL78): Die Punktmutation G[-1]A in pCL78 wurde mittels einer Punktmutations-PCR mit den Primern 5'-GATTCAGAATTCTC CGCATGCATCAGTGGAGATAG-3' (oCL70) und 5'-CTATCTCCACTGATGCATGCGG

AGAATTCTGAAATC-3' (oCL70-r), und unter Verwendung des Plasmids pNB05 als DNA-Templat, eingeführt.

Konstrukt 22, MBP-Int^C(105-154, N154A)-Trx(Ser[+1]Ala)-His₆ (pCL77): Das Fragment Int^C(105-154)-Trx wurde vom Templat pCL20 durch eine PCR mit den Oligonukleotiden 5'-ATACCATGGGCACTAGTTCACCAGAAATAGAAAAGTTGTC-3' (oHM116) und 5'-ATAAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATG-3' (oHM135) amplifiziert. Anschließend wurde das Genfragment mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *HindIII* inkubiert und im folgenden Schritt in die *XbaI*- und *HindIII*-Schnittstellen des pMAL-c2X-Vektors (*NEB*) kloniert. Dieses Plasmid wiederum diente als Templat in der anschließenden Punktmutations-PCR mit den Primern 5'-GTCGCCAATGACATCATTGTGCATGCGGCGATTGAAGGATCCGGAGGAGG-3' (oCL73) und 5'-CCTCCTCCGGATCCTTCAATCGCCGCATGCACAATGATGTCATTGGCGACCCGCTG-3' (oCL73-r). Das Produkt dieser PCR war das Zielplasmid pCL77.

4.2 Protein-Techniken

Alle in dieser Arbeit angewendeten Methoden zur Proteinanalytik wurden nach Standardvorschriften durchgeführt [142]. Diese Techniken umfassen: die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) mit Natriumdodecylsulfat (SDS) [147] oder unter nativen Bedingungen, die Coomassie-Brilliant Blue R250 Färbung der Polyacrylamidgele [148], die Western-Blot Analyse [149] mit dem Penta-HisTM-Antikörper der Firma *Qiagen*, sowie die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration [150]. Eine detaillierte Beschreibung dieser Methoden kann außerdem in der angegebenen Diplomarbeit eingesehen werden [146]. Weiterhin befindet sich eine Übersicht aller verwendeter Puffersysteme und Lösungen in Kapitel 3.6.

4.2.1 Proteinexpression in *E. coli*

Für die Genexpression der in Tabelle 13 aufgelisteten Konstrukte wurden 300 bis 1200 mL Luri-Bertani-Vollmedium (LB-Medium) mit einer Übernachtskultur aus einer Einzelkolonie des jeweiligen *E. coli* BL21 (DE3) Expressionsstamms angeimpft. Das Verhältnis von Vollmedium zu Übernachtskultur betrug hierbei stets 100 zu 1. Das dem jeweiligen Expressionsplasmid entsprechende Antibiotikum wurde in einer Konzentration von 50 µg/mL

Kanamycin bzw. 100 µg/mL Ampicillin dem LB-Medium beigefügt. Das Expressionsmedium des MBP-haltigen Konstrukts **14** enthielt zusätzlich 0,2% Glukose, um die Produktion der *E. coli*-eigenen Amylase zu unterdrücken. Bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,4 erfolgte die Inkubation des Mediums immer bei 37°C und 250 rpm. An diesem Punkt wurde die Temperatur auf 25°C bis 30°C erniedrigt, um bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 mit 0,4 mM Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG) die Expression zu induzieren. Nach der Induktion wurden die Zellen für weitere 3 h bis 4 h bei 25°C bis 30°C inkubiert und schließlich pelletiert (7000 rpm, 15 min, 4°C). Abhängig von der anschließenden Aufreinigungsmethode wurde das Pellet in 10 bis 30 mL Ni²⁺-NTA-Puffer A, Amylose-Puffer A oder Strep-Tag-Puffer A (siehe Kapitel 3.6) resuspendiert und bis zur Aufreinigung bei -80°C gelagert.

4.2.2 Zellaufschluss

Die gründlich resuspendierten Zellen wurden mit Hilfe eines Emulsifiers (Emulsiflex-C5) der Firma *Avestin* bei einem Druckunterschied von ca. 7 MPa aufgeschlossen. Für einen vollständigen Zellaufschluss wurde diese Prozedur zweimal wiederholt. Die löslichen und unlöslichen Bestandteile der erhaltenen Suspensionen wurden anschließend mittels eines Zentrifugationsschritts (17000 rpm, 30 min, 4°C) voneinander getrennt. Je nach dem, ob sich das gewünschte Zielprotein in der löslichen Fraktion des Überstandes oder im unlöslichen Zellpellet befand, wurde die Proteinreinigung entweder unter nativen, oder unter denaturierenden Bedingungen fortgesetzt.

4.2.3 Chromatographische Proteinreinigung

4.2.3.1 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie

Alle dargestellten Proteinkonstrukte dieser Arbeit (Tabelle 13 im Anhang) besaßen einen N- oder C-terminalen Affinitäts-Tag mit dessen Hilfe das Protein chromatographisch gereinigt werden konnte. Am häufigsten genutzt wurde in diesem Zusammenhang die Ni²⁺-NTA-Chromatographie über einen C-terminalen Hexahistidin-Tag (His₆-Tag). Die Reinigung von Konstrukt **14** (MBP-Int^N(1-12)-R) erfolgte dagegen mit Hilfe des N-terminalen MBP-Tags über eine Amylose-Säulenchromatographie. Die Konstrukte **1** (Strep-Trx-Int^N(1-12)-R) und **1a** (Strep-Trx-Int^N(1-12, Cys1Ala)-R) konnten über den N-terminalen Strep-Tag II mit Hilfe einer Strep-Tactin-Matrix gereinigt werden. Alle erhaltenen Proteinfractionen wurden mittels

SDS-PAGE analysiert, die geeigneten Fraktionen vereinigt und gegen Spleißpuffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 10-20% Glycerin, pH 7,0) dialysiert. Die finale Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des theoretischen Extinktionskoeffizienten bei 280 nm photometrisch bestimmt (siehe Tabelle 13).

Affinitätschromatographie an immobilisierten Ni²⁺-Ionen

Auf eine detaillierte Beschreibung der theoretischen Grundlagen zur Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie wird an dieser Stelle verzichtet und stattdessen auf die bereits verfasste Diplomarbeit verwiesen [146]. In diesem Kapitel sollen lediglich alle notwendigen Informationen zur praktischen Durchführung der chromatographischen Reinigungen beschrieben werden.

His₆-Tag tragende Proteine, welche sich nach dem Zellaufschluss in der löslichen Fraktion befanden, wurden mittels einer Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie über eine FPLC-Anlage (*fast-performance liquid chromatography*) der Firma *GE Healthcare* („Äkta prime plus“) gereinigt. Als Säulenmatrix wurde entweder das Ni²⁺-NTA-Material „Superflow“ der Firma *Qiagen* oder die „Ni-Sepharose 6 fast flow“ der Firma *GE Healthcare* verwendet. Das übliche Säulenvolumen von 1-2 mL wurde in einem ersten Schritt mit der mindestens 10-fachen Menge an Ni²⁺-NTA-Puffer A (50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0) äquilibriert. Das im selben Puffer resuspendierte Zelllysate wurde anschließend mit einer maximalen Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min durch einen linearen Gradienten von 0% bis 100% Ni²⁺-NTA-Puffer B (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0) über einen Zeitraum von ca. 20 Minuten.

Proteine, die sich nach dem Zellaufschluss in der unlöslichen Fraktion befanden (Konstrukt **10**, **16**, **17** und **18**), wurden unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Hierfür wurde das Zellpellet in einem 8 M Harnstoff-haltigem Ni²⁺-NTA-Puffer A gelöst. Die Reinigung dieser Lösung konnte aufgrund des Harnstoffs nicht an einer FPLC-Anlage durchgeführt werden, sondern erfolgte mit Hilfe einer „Gravity-Flow-Säule“ der Firma *Biorad* im Batch-Verfahren. Die Elution des Zielproteins gelang in diesem Fall nicht durch einen linearen Gradienten, sondern durch das schrittweise Waschen mit 8 M Harnstoff-haltigem Ni²⁺-NTA-Puffer mit stetig steigender Imidazolkonzentration (12,5 mM, 60 mM, 125 mM und 250 mM). Bevor die unter denaturierenden Bedingungen gereinigten Proteine in einer Spleißreaktion eingesetzt werden konnten, mussten sie in ihre katalytisch aktive Struktur zurückgefaltet werden. Dies erfolgte mit Hilfe von drei Dialyseschritten bei 4°C gegen einen

Harnstoff-freien Spleißpuffer (siehe Kapitel 3.6), wobei ca. 50% der gereinigten Proteinmenge rückgefaltet werden konnte.

Strep-Tag II basierte Affinitätschromatographie

Der Strep-Tag II besteht aus einer Octapeptidsequenz (WSHPQFEK) und bindet mit einer hohen Affinität an das Säulenmaterial Strep-Tactin der Firma *IBA* ($K_d = 1 \mu\text{M}$). Strep-Tactin stellt eine für die Strep-Tag II-Bindung optimierte Version des Proteins Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* dar. Genauso wie das Protein Avidin aus dem Hühnerei, besitzen auch Streptavidin und Strep-Tactin eine extrem hohe Affinität zum Biotinmolekül ($K_d = 1$ bis 100 pM). Durch Zugabe des Biotin-Derivats Desthiobiotin können Strep-Tag II-tragende Proteine kompetitiv von einer Strep-Tactin-Säulenmatrix verdrängt und in gereinigter Form eluiert werden. Der Vorteil bei der Verwendung von Desthiobiotin anstelle von Biotin als Elutionsmittel liegt in der möglichen Regeneration und Wiederverwendung der Säulenmatrix, während die Biotin-Strep-Tactin Bindung so gut wie irreversibel ist.

Die Reinigung der Konstrukte mit einem N-terminalen Strep-Tag II (**1** und **1a**) erfolgte mit Hilfe der „Gravity-Flow-Säulen“ der Firma *Biorad* im Batch-Verfahren. Die Strep-Tactin-Matrix mit einem Säulenvolumen von ca. 2 mL wurde zunächst mit dem mindestens 10-fachen Volumen an Strep-Tag-Puffer A (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) äquilibriert. Nach der Auftragung des ebenfalls in Strep-Tag-Puffer A vorliegenden Zelllysats und mehreren Waschschritten erfolgte die Elution mit dem 2,5 mM Desthiobiotin enthaltenden Strep-Tag-Puffer B.

Proteinreinigung mittels Amylose-Säulenchromatographie

Fusionsproteine mit einem Maltose-bindenden Protein (MBP) können mit Hilfe der Amylose-Säulenchromatographie gereinigt werden. Das MBP ist ein Teil des Maltose/Maltodextrin-Systems aus *E. coli* und sorgt für die Aufnahme und den Katabolismus dieser Kohlenhydrate. Sowohl das Disaccharid Maltose, als auch das Polysaccharid Amylose bestehen aus α -1,4-glykosidisch verknüpften Glukoseeinheiten und binden beide selektiv an MBP. An eine Amylose-Matrix immobilisierte MBP-Fusionsproteine können daher mit Hilfe eines Maltosehaltigen Puffers eluiert werden. Bei einer Expression von Proteinen in *E. coli*, welche über eine Amylose-Säulenchromatographie gereinigt werden sollen, ist ein Zugabe von 0,2% Glukose ratsam, da auf diese Weise die Produktion der *E. coli* eigenen Amylase unterdrückt und ein Abbau der Amylose-Matrix verhindert werden kann.

Konstrukt **14** (MBP-Int^N(1-12)-R) ist das einzige Protein dieser Arbeit, welches mit Hilfe der Amylose-Säulenchromatographie gereinigt wurde. Die Chromatographie erfolgte mit „Gravity-Flow-Säulen“ der Firma *Biorad* im Batch-Verfahren. Die Amylosematrix, mit einem Säulenvolumen von 2-4 mL, wurde zunächst mit 20 bis 40 mL Amylose-Puffer A (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) äquilibriert. Anschließend wurde das ebenfalls im Amylose-Puffer A vorliegende Zelllysate aufgetragen. Nach drei Waschschrritten erfolgte die Elution mit Amylose-Puffer B, welcher zusätzlich zu Puffer A 10 mM Maltose enthielt.

4.2.3.2 Anionenaustauschchromatographie

Eine Anionenaustauschchromatographie wurde in dieser Arbeit entweder bei der Darstellung semisynthetischer Proteine im präparativen Maßstab oder als zusätzlicher zweiter Reinigungsschritt für die Konstrukte **7**, **7b** und **7c** genutzt, um eine Proteinreinheit von mindestens 95% zu erzielen. Ein solch hoher Reinheitsgrad war für die Durchführung der kinetischen Untersuchungen der Spleißreaktionen und der Inteinfragment-Assoziationen eine wichtige Voraussetzung.

Das Prinzip der Anionenaustauschchromatographie basiert auf der Interaktion negativ geladener Proteine mit einer positiv geladenen Säulenmatrix (quartäres Ammoniumion). Der Ladungszustand eines jeden Proteins ist pH-Wert abhängig und wird durch den isoelektrischen Punkt (pI-Wert) charakterisiert. Folglich muss für eine erfolgreiche Anionenaustauschchromatographie der pH-Wert des verwendeten Puffers um 1 bis 2 pH-Punkte höher liegen als der pI-Wert des zu reinigenden Proteins, da nur unter diesen Bedingungen das Protein negativ geladen vorliegt. Der pI-Wert der Proteine **7**, **7b** und **7c** betrug 6,5, so dass für den Anionenaustauschpuffer in dieser Arbeit ein pH-Wert von 8,0 verwendet wurde.

In einem ersten Schritt mussten die bereits Ni²⁺-NTA-gereinigten Proteine durch eine Dialyse gegen den Anionenaustauschpuffer A (50 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8,0) umgepuffert werden. Die eigentliche Chromatographie erfolgte mit Hilfe der FPLC-Anlage „Äkta prime plus“ und mit der 1 mL großen „HiTrap-Q-HP“ Anionenaustauscher-Säule der Firma *GE Healthcare*. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit mindestens 10 mL Anionenaustauschpuffer A wurde das Zielprotein mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min aufgetragen. Die Elution erfolgte durch einen Salzgradienten von 0 bis 100% Anionenaustauschpuffer B (wie A, aber mit 500 mM NaCl) über einen Zeitraum von 30 Minuten.

4.2.4 Koexpression in *E. coli*

Zur *in vivo* Untersuchung der Intein-vermittelten C-terminalen Spaltungsreaktion wurde ein Fusionsprotein aus Ex^N und Int^N (Konstrukt **1** oder Konstrukt **14**) mit seinem Partnerkonstrukt aus Int^C und Ex^C (Konstrukt **7**) in *E. coli* koexprimiert. Während die Int^N-Expressionsplasmide eine Resistenzkassette für Ampicillin trugen, vermittelte das Plasmid von Konstrukt **7** eine Kanamycin-Resistenz. Die Koexpression konnte demzufolge mit Hilfe beider Selektionsmarker durchgeführt werden. Weiterhin besaßen alle Plasmide den gleichen Promotor (T7), wodurch vergleichbare Mengen der exprimierten Ausgangsproteine in der Zelle vorlagen.

Experimentell durchgeführt wurde die Koexpression in LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin und 50 µg/mL Kanamycin bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6. An dieser Stelle wurde die Temperatur auf 28°C gesenkt, und die Zellen wurden mit 0,4 mM IPTG induziert. Die Probenentnahme erfolgte direkt vor der Induktion (0 h), nach 2 h und nach 18 h Inkubation bei 28°C. Die entnommenen Zellen wurden pelletiert (8000 rpm, 1 min) und durch Zugabe von 4xSDS-Probenpuffer und einem anschließenden Denaturierungsschritt (95°C, 10 min) lysiert. Die abschließende Analyse erfolgte mittels Western-Blot durch einen primären Penta-His-Antikörper (*Qiagen*) und einen sekundären Horseradish-Peroxidase-markierten Anti-Maus-Antikörper (ECL Westernblotting System, *GE Healthcare*).

4.3 Peptidchemie

4.3.1 Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie

Bei der chemischen Synthese von Peptiden werden Aminosäuren durch die Bildung von Amidbindungen mittels Kondensationsreaktionen miteinander verknüpft. Eine wichtige Entwicklung in der Peptidchemie war die Etablierung der Festphasenpeptidsynthese durch Bruce Merrifield [151, 152]. Bei dieser Methode wird das Peptid an einer polymeren Trägermatrix schrittweise vom C- zum N-Terminus aufgebaut, so dass die wachsende Peptidkette immer fest mit dem Trägermaterial verbunden bleibt, während nicht umgesetzte Reagenzien einfach gewaschen werden können. Da jeder verwendete Aminosäurebaustein sowohl eine Aminogruppe als auch eine Carboxylfunktion enthält, muss für einen gerichteten Ablauf der Peptidsynthese die α -Aminogruppe reversibel geschützt werden (temporäre Schutzgruppe). Zu diesem Zweck wird bei der Peptidsynthese nach Fmoc-Strategie der Fluorenylmethoxycarbonyl-Rest (Fmoc) verwendet [153], welcher über eine Urethanbindung

an die α -Aminogruppe eines Aminosäurebausteins gebunden ist und unter milden basischen Bedingungen (20% - 40% Piperidin) abgespalten werden kann. Nach der Abspaltung folgt die Kupplung der nächsten N-terminal geschützten Aminosäure. Dieser Zyklus aus Kupplung, Abspaltung und Waschschritten wird solange wiederholt, bis die gewünschte Peptidsequenz aufgebaut ist. Für eine erfolgreiche Kondensationsreaktion zwischen einer Amino- und einer Carboxylgruppe muss der Carboxylkohlenstoff durch elektronenziehende Gruppen aktiviert werden. Hierzu diente im Rahmen dieser Arbeit das Aktivierungsreagenz 2-(H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluor-phosphat (HBTU), welches unter Zugabe einer sterisch anspruchsvollen Base (z.B. Diisopropyletylamin) mit der freien Carboxylgruppe einen HOBt-Aktivester ausbildet. Um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden, müssen darüber hinaus die reaktiven Seitenketten der trifunktionellen Aminosäuren (Lys, Arg, His, Glu, Asp, Ser, Thr, Tyr, Cys) ebenfalls in reversibler, und zur Fmoc-Schutzgruppe orthogonaler Form geschützt werden (permanente Schutzgruppen). Im Rahmen des Fmoc-Syntheseprotokolls dieser Arbeit wurden hierfür *tert*-Butylether (für Ser), *tert*-Butylester (für Asp und Glu), die Triphenylmethylgruppe (für Cys) und die *tert*-Butoxycarbonylgruppe (für Lys) verwendet. Alle diese permanenten Schutzgruppen sind unter den basischen Bedingungen der Fmoc-Entschützung stabil, können aber unter stark sauren Bedingungen (80% TFA) abgespalten werden. Ebenfalls bei einem stark sauren pH-Wert erfolgt die finale Abspaltung des aufgebauten Peptids vom Harz, bei der die kovalente Bindung zwischen der C-terminalen Aminosäure und der Ankergruppierung des polymeren Trägers getrennt wird. Harzabspaltung und Seitenkettenentschützung werden demzufolge häufig in einem Schritt vollzogen. Mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese, welche aufgrund der immer gleichen Schritte von Kondensation, Waschen und Entschützen auch automatisiert ablaufen kann, können Peptide mit einer Länge von ca. 50 Aminosäuren hergestellt werden. Mit optimierten Synthesevorschriften und durch die Verwendung von Hilfsmitteln, wie Pseudoproline [154, 155] oder Isoacyldipeptide [156], konnte die synthetisierbare Peptidlänge in einzelnen Fällen sogar auf bis zu 100 Aminosäurebausteine erweitert werden.

4.3.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Fmoc-basierten Festphasenpeptidsynthese

Die Festphasenpeptidsynthese der Peptide dieser Arbeit (Übersichtstabelle 12 im Anhang) wurde teilweise an einem Peptidsynthesizer der Firma *Multisyntech* (Syro XP) in automatisierter Form, teilweise aber auch manuell in einer Glasfritte durchgeführt, wobei sich die Syntheseprozedur beider Ansätze prinzipiell nicht unterschied. Die Ansatzgröße betrug in

beiden Fällen stets 0,1 mmol. Als Trägermatrix diente bei fast allen Peptiden (Ausnahme Pep18, siehe unten) ein mit der jeweiligen C-terminalen Aminosäure bereits vorbeladenes Wang-Harz (100-200 Maschen, Firma *Novabiochem*). Die eigentliche Syntheseprozedur wurde nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt: Nach einem einmaligen 10-minütigen Quellschritt des Wang-Harzes in DMF, wurde die vorbeladene, aber noch Fmoc-geschützte Aminosäure durch zweimalige Inkubation mit einer 40%-igen Piperidinlösung in DMF entschützt (je ca. 10 Minuten). Nach dreimaligem Waschen mit DMF erfolgte die Kupplungsreaktion durch Zugabe von 5 Äquivalenten (eq.) des zweiten Aminosäurebausteins, 4,8 eq. HBTU und 6 eq. NMM (N-Methylmorpholin, bei manueller Kupplung) oder DIPEA (bei Kupplungen am Peptidsynthesizer). Bei einer manuellen Synthese betrug die Kupplungsdauer ca. 2 h, während am Peptidsynthesizer lediglich 1 h lang gekuppelt wurde. Abschließend wurde das Harz wieder in drei Schritten mit DMF gewaschen, so dass ein neuer Zyklus zur Aminosäurekupplung beginnen konnte. Zusätzlich ist anzumerken, dass sowohl die vier verzweigt-kettigen Aminosäuren (Ile2, Leu7, Ile8 und Leu10) als auch Asp5 innerhalb der Int^N-Sequenz doppelt gekuppelt wurden, um die Effizienz dieser Reaktionsschritte zu verbessern. Die Aminosäure Cys1 stellte eine Ausnahme dar und wurde nicht unter den eben beschriebenen Bedingungen eingeführt. Stattdessen wurde in diesem speziellen Fall ein Pentafluorophenyl-aktivierter Cystein-Baustein verwendet (Fmoc-Cys(Trt)-OPfp), um eine Racemisierung des Cysteins sicher ausschließen zu können [157].

Nach dem Aufbau der Peptidkette wurde in einem letzten Reaktionsschritt das Fluorophor 5,6-Carboxyfluorescein, ebenfalls durch einer Peptidbindung, an den freien N-Terminus gekuppelt. Diese Reaktion erfolgte an der festen Phase und analog zur Aminosäurekupplung, d.h. es wurde mit 5 eq. 5,6-Carboxyfluorescein (188,2 mg), 4,7 eq. HBTU (178,3 mg) und 6 eq. NMM (1,5 mL 400 mM NMM in DMF) gekuppelt. Um eine möglichst quantitative Produktbildung zu gewährleisten, wurde die Kupplung doppelt durchgeführt und die Reaktionszeit beider Kupplungsschritte auf 7 h bis 14 h verlängert.

Während fast alle Peptide mit einer C-terminalen Carboxylgruppe synthetisiert wurden, stellte Pep18 eine Ausnahme dar. Hier wurde durch die Verwendung eines Rink-Amid-Harzes der Firma *Novabiochem* nach der Harz-Abspaltung mit TFA eine C-terminale Amidgruppe generiert. Da das Rink-Amid-Harz nicht bereits mit einer Aminosäure vorbeladen war, bestand der erste Schritt der Pep18-Synthese in der Kupplung des C-terminalen Alanins direkt an die freie Aminofunktion der Trägermatrix, um dann die Synthese des Peptids wie oben beschrieben fortzusetzen.

4.3.3 Seitenkettenentschützung und Harzabspaltung

Die finale Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Peptiden mit „Reagent K“, einem Abspaltmix aus 82,5% TFA, 5% Phenol, 5% H₂O, 5% Thioanisol und 2,5% Ethandithiol. Die stark sauren TFA-Bedingungen dienten hierbei, neben dem Abtrennen des Peptids vom Trägermaterial, auch zur Entfernung der permanenten Seitenkettenschutzgruppen. Die Scavenger-Substanzen Thioanisol, Phenol und Ethandithiol wurden zugefügt, um die entstehenden Spaltungsprodukte abzufangen. Zur Abspaltung wurde das am Harz befindliche Peptid in einen Spritzenreaktor überführt und in 5 mL „Reagent K“ 3 h inkubiert. Anschließend erfolgte die quantitative Fällung des freien Peptids in 50 mL eiskaltem Diethylether. Durch Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm für 10 min konnte der überstehende Ether dekantiert und das pelletierte Peptid in wenigen mL H₂O gelöst, gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert werden. Die Reinigung dieses Rohextraktes erfolgte mittels präparativer HPLC.

4.3.4 Peptidreinigung mittels präparativer HPLC

Zur Reinigung der synthetisierten Peptide wurde jeweils eine HPLC im präparativen Maßstab mit einem Gerät der Prostar-Serie der Firma *Varian* durchgeführt. Als stationäre Phase diente eine Microsorb 300-5 C18 Säule der gleichen Firma. Als HPLC-Puffer A wurde H₂O mit 0,05% TFA verwendet, welches zuvor durch eine 30-minütige Inkubation im Ultraschallbad entgast worden war. Als HPLC-Puffer B diente Acetonitril mit ebenfalls 0,05% TFA. Zunächst wurden ca. 30 bis 40 mg des Rohpeptids in 5 mL einer Mischung aus 94,5% ddH₂O, 5% Acetonitril und 0,05% TFA gelöst. Nach der Auftragung auf die präparative Säule mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 mL/min begann die Elution des Peptids. Der hierfür verwendete Gradient umfasste eine 5 minütige Äquilibration mit 5% Puffer B, einen relativ schnellen Anstieg auf 41% Puffer B innerhalb der nächsten 32 Minuten, eine sehr langsame Erhöhung der Puffer B-Konzentration auf 43% zwischen der 37sten und der 45sten Minute (hier eluierten die Peptide üblicher Weise), und schließlich einen sehr schnellen Anstieg auf 100% Puffer B (45ste bis 50ste Minute). Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend durch MALDI-TOF-MS analysiert. Fraktionen welche die berechnete Masse in hohem Reinheitsgrad enthielten wurden vereinigt, gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert. Zusätzlich wurde die Reinheit der auf diese Weise erhaltenen Peptide mittels eines analytischen 1100 HPLC-Systems der Firma *Agilent* überprüft. Hier diente eine Eclipse XDB-

C18-Säule der gleichen Firma als stationäre Phase. Auf diese Weise konnte der Reinheitsgrad aller in dieser Arbeit verwendeter Peptide mit mindestens 95% bestimmt werden.

4.3.5 Photometrische Bestimmung der Peptidkonzentration

Bevor ein gereinigtes Peptid in einem biochemischen Assay eingesetzt werden konnte, wurde eine ca. 1 mM Stocklösung hergestellt. Als Lösemittel diente Spleißpuffer mit TCEP anstelle von DTT als reduzierendes Additiv und ohne Zugabe von Glycerin (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM TCEP, pH 7,0). Aufgrund von TFA-Rückständen im gefriergetrockneten Peptid war es wichtig den pH-Wert der fertigen Stocklösung nochmals zu überprüfen, und eventuell auf pH 7,0 neu einzustellen. Die genaue Konzentrationsbestimmung der Stocklösungen erfolgte mit Hilfe der spezifischen Absorption von Carboxyfluorescein bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm. Die entsprechenden Messungen wurden mit Mischungen aus 2 µL der Peptid-Stocklösungen in 98 µL einem 50 mM Tris-Puffer bei pH 9,0 mit einem UV/Vis-Spektrometer der Firma *Amersham Bioscience* durchgeführt. Zur Berechnung der Konzentration (c) diente das Lambert-Beersche Gesetz:

$$c = \frac{A_{492nm}}{d \cdot \varepsilon_{492nm}} \quad (\text{Gl. 1})$$

wobei eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke (d) von 1 cm und ein Extinktionskoeffizient von $\varepsilon = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ genutzt wurde. Dieser Koeffizienten ist auf der Internetseite der Firma *Reseach Organics* angegeben (<http://resorg.com/Catalog/Brochures/FluorescentLabels.pdf>), und wurde dort experimentell mittels Lösungen aus 5- bzw. 6-Carboxyfluorescein in Methanol und 0,1 M NaOH bestimmt.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 SDS-PAGE Analyse der Spleißreaktion

Die Analyse der Spleißproduktbildung sowie der C-terminalen Spaltungsreaktion aller Peptide und Proteine dieser Arbeit (Übersichtstabellen 12 und 13 im Anhang) erfolgte mittels SDS-PAGE. Die Reaktionspartner der entsprechenden Int^N- und Int^C-Konstrukte wurden hierfür, sofern nicht anders angegeben, in äquimolaren Mengen in einem

Konzentrationsbereich von 10 bis 60 μM bei 25°C miteinander umgesetzt. Als Puffersystem diente Spleißpuffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 10 - 20% Glycerin, pH 7,0). Direkt vor dem Start der Reaktion wurden beide Reaktionspartner stets mit 2 mM einer frisch angesetzten TCEP-Lösung umgesetzt, um sicherzustellen, dass alle Cysteinreste in ihrer reduzierten Form vorlagen. Jedem Reaktionsansatz wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 - 48 h) Proben mit einem Volumen von je 20 μL entnommen, welche sofort mit 10 μL 4xSDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 3.6) versetzt und 10 min bei 95°C aufgeköcht wurden. Anschließend erfolgte die Analyse mittels SDS-PAGE und Coomassie-Anfärbung. Bei Reaktionen mit Fluorescein-markierten Peptiden wurde das Polyacrylamidgel zusätzlich vor der Coomassie-Färbung mit UV-Licht ($\lambda_{\text{max}} = 312 \text{ nm}$) bestrahlt, um auf diese Weise Fluorophor-markierte Produktbanden zu identifizieren. Die Intensität der Coomassie-gefärbten Proteinbanden wurde densitometrisch mit Hilfe des Programms *Scion Image* ausgewertet (siehe Kapitel 4.5.1).

Bei den temperaturabhängigen Messungen in Kapitel 5.1.3 wurde das Konstrukt **7** (Int^C-Trx-His₆) in Spleißpuffer bei der entsprechenden Temperatur für 10 Minuten präinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von Pep1-Stocklösung (Fl-SEFSG-Int^N) gestartet wurde. Die Einstellungen des pH-Wertes und der Salzkonzentration in den entsprechenden Untersuchungen des gleichen Kapitels erfolgten durch Dialyse von Konstrukt **7** gegen einen Spleißpuffer mit den jeweiligen neuen Parametern. Auch die erniedrigte Salzkonzentration des Puffers in Kapitel 5.2.5 (20 mM NaCl) wurde mittels einer Dialyse von Konstrukt **7** erreicht. Da das beim Reaktionsstart zugegebene Volumen der Peptid-Stocklösungen im Vergleich zum Volumen der vorgelegten Proteine maximal 5% betrug, wurde eine Veränderung der Pufferbedingungen durch diese Zugabe vernachlässigt.

4.4.2 SDS-PAGE und native PAGE der Komplexbildungsreaktionen

Die Analyse der Komplexbildungseigenschaften der verschiedenen Peptide wurde mit Hilfe der beiden Proteinmutanten **7b** und **7c** durchgeführt. In diesen beiden Mutanten waren entweder die zwei katalytisch essentiellen Aminosäuren Asn154 und Ser[+1] (Konstrukt **7b**), oder zusätzlich auch noch das beim N \rightarrow S-Acyltransfer entscheidend beteiligte His73 zu Alanin mutiert worden (Konstrukt **7c**). Die experimentelle Umsetzung der Komplexbildungsreaktionen erfolgte analog zu den bereits in Kapitel 4.4.1 beschriebenen Spleißreaktionen, allerdings wurden die entnommenen Proben zur Aufrechterhaltung der Komplexstruktur vor einer Auftragung auf das Polyacrylamidgel nicht aufgeköcht. Eine PAGE unter nativen Bedingungen wurde analog zur SDS-PAGE durchgeführt, mit der

Ausnahme, dass auf jegliches SDS im Polyacrylamidgel und in allen genutzten Puffern (Laufpuffer und Probenpuffer) verzichtet wurde.

4.4.3 Präparative Protein-Semisyntese

Um präparativ semisyntetische Proteine herzustellen, wurden die bereits in analytischen Mengen durchgeführten Spleißreaktionen in einem großen Maßstab wiederholt. Auf diese Weise stand genug Material zur Verfügung, um anschließend mittels chromatographischer Methoden das semisyntetische Produkt zu reinigen und auf die enzymatische Aktivität hin zu untersuchen. Diese Prozedur wurde für zwei Modellproteine (Thioredoxin und β -Lactamase) durchgeführt.

4.4.3.1 Herstellung eines N-terminal modifizierten Thioredoxins

Das käuflich erworbene Peptid Pep1 (Fl-SEFSG-Int^N) wurde mit Konstrukt 7 (Int^C-Trx-His₆) in äquimolaren Konzentrationen (je 62 μ M) in einem Gesamtvolumen von 1,5 mL umgesetzt. Nach 24 h Inkubation bei 25°C und Dialyse gegen Anionenaustausch-Puffer A, wurden die einzelnen Komponenten des Reaktionsansatzes mittels einer Anionenaustauschchromatographie (siehe Kapitel 4.2.3.2) voneinander getrennt. Auf diese Weise gelang die vollständige Separation des Spleißprodukts vom C-terminalen Spaltprodukt, sowie vom Ausgangsprotein 7. Die Fraktion des gewünschten Zielproteins 8 war lediglich noch mit nicht umgesetztem Pep1 verunreinigt, welches nach einer weiteren Dialyse gegen Ni²⁺-NTA-Puffer A und einer Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie ebenfalls abgetrennt werden konnte. Die Gesamtausbeute an semisyntetischem Produkt 8 betrug ca. 30%, was einer Menge von 0,4 mg Protein entsprach.

4.4.3.2 Herstellung einer N-terminal modifizierten β -Lactamase

Für die präparative Herstellung einer N-terminal mit Carboxyfluorescein markierten β -Lactamase wurde das käuflich erworbene Pep1 (Fl-SEFSG-Int^N) mit dem denaturierend gereinigten und rückgefalteten Konstrukt 10 (Int^C- β Lac-His₆) in äquimolaren Mengen (je 12 μ M) umgesetzt. Das Gesamtvolumen betrug in diesem Fall 3 mL und die Inkubation erfolgte bei 25°C für 42 h. Die Reinigung des Zielproteins gelang analog zu der in Kapitel 4.4.3.1 beschriebenen Prozedur aus Anionenaustausch- und Ni²⁺-NTA-Chromatographie. Somit konnte

das semisynthetische Produkt **11** (F1-SEFSG- β Lac) mit einer Gesamtausbeute von ca. 30% (0,3 mg) und in einem hohen Reinheitsgrad erhalten werden.

4.4.4 Der enzymatische Thioredoxin-Assay

Der Thioredoxin-Aktivitätstest wurde nach einer auf Insulin basierenden Methode von Holmgren durchgeführt [158]. Thioredoxin katalysiert hierbei die Reduktion der drei im Insulin vorliegenden Disulfidbrücken, was die Freisetzung der β -Insulinkette auslöst, welche in wässriger Lösung sofort zu präzipitieren beginnt. Der zeitliche Verlauf dieser Präzipitation kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 650 nm verfolgt und quantifiziert werden.

Eine Insulin-Stocklösung wurde in einem Puffer bestehend aus 50 mM Tris und 2 mM EDTA bei pH 7,0 mit einer Konzentration von 10 mg/mL angefertigt. Durch ein Ansäuern der Lösung auf pH 2-3 konnte das Insulin vollständig gelöst werden und verblieb auch nach einer schnellen Rücktitration auf pH 8,0 in Lösung. Die Lagerung dieser Stocklösung erfolgte bei -20°C . Zur Durchführung des Thioredoxin-Assays wurden Insulin (0,1%), EDTA (2 mM) und das zu untersuchende semisynthetische Produkt **8** (10 μM) in einem Puffer aus 20 mM Tris und 300 mM NaCl bei pH 8,0 und bei Raumtemperatur gemischt. Durch die Zugabe von 1 mM DTT wurde die Reaktion gestartet (200 μl Gesamtvolumen) und die Präzipitation des Insulins bei 650 nm verfolgt. Als Positivkontrolle dieses Assays diente Konstrukt **1** (Strep-Trx-Int^N), welches das vollständige Thioredoxin mit lediglich zwei kurzen Peptidsequenzen an N- und C-Terminus darstellte. Ebenfalls durchgeführt wurden zwei Negativkontrollen, bei denen entweder kein DTT oder kein Thioredoxin-Konstrukt dem Reaktionsansatz zugegeben wurde.

4.4.5 Der enzymatische β -Lactamase-Assay

Zur Bestimmung der β -Lactamase-Aktivität des semisynthetischen Produkts F1-SEFSG- β Lac-His₆ (Konstrukt **11**) wurde die Hydrolyse von Nitrocefin photometrisch untersucht. Nitrocefin ist ein β -Lactamring-Derivat, welches sich bei einer Spaltung des Lactamrings von gelb nach rot verfärbt, was mittels einer Absorptionsmessung bei 486 nm quantifiziert werden kann [159].

Eine kinetische Studie wurde anhand der Reaktion von 5 nM des zu untersuchenden β -Lactamase-Konstrukts mit verschiedenen Konzentrationen an Nitrocefin (10 bis 200 μM) in 50 mM Tris-Puffer bei pH 7,0 durchgeführt. Dabei wurde der theoretische molare

Extinktionskoeffizient des hydrolysierten Nitrocefins von $\varepsilon = 20500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet. Durch eine Auftragung der ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der verwendeten Nitrocefin-Konzentration konnten schließlich die kinetischen Parameter K_M (Michaelis-Menten-Konstante) und k_{cat} (Wechselzahl) bestimmt werden. Als Positivkontrolle diente in diesem Assay eine rein rekombinant generierte und über Ni^{2+} -NTA-Chromatographie gereinigte β -Lactamase ($\beta\text{Lac-His}_6$). Die Durchführung des Assays unter exakt gleichen Bedingungen aber mit dem β -Lactamase-freien Konstrukt **7** ($\text{Int}^{\text{C}}\text{-Trx-His}_6$) diente als Negativkontrolle.

4.4.6 Proteinmodifikation im *E. coli* Zellextrakt

Zur N-terminalen Modifikation eines Zielproteins mit Carboxyfluorescein im *E. coli* Zellysats wurde Konstrukt **7** ($\text{Int}^{\text{C}}\text{-Trx-His}_6$) in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert und die Zellen anschließend direkt in Spleißpuffer (siehe Kapitel 3.6) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe eines Mikrofluidizers. Nach direkter Zugabe des Int^{N} -Gegenstücks in Form von Pep**3** (90 μM) zur löslichen Fraktion des Zellysats wurde der Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 100 μL bei 25°C inkubiert. Die Analyse des Zellextrakts erfolgte schließlich mittels SDS-PAGE und anschließender UV-Illumination und Coomassie-Anfärbung.

4.4.7 Modifikationsreaktionen der Cysteinseitenkette

Bei der Bildung des in dieser Arbeit beschriebenen Thiazolinrings kam es zu einem nukleophilen Angriff der Cys1-Seitenkette auf das Carbonylkohlenstoffatom der davorliegenden Peptidbindung. Durch diesen Ringschluss war die Thiofunktion des Cysteins nicht mehr frei zugänglich, was indirekt mit Hilfe von Cystein-modifizierenden Reagenzien überprüft werden konnte. Bei der semisynthetischen Reaktion von Doppelmutante **7b** mit Pep**17** kam hierfür das sterisch anspruchslose Reagenz N-Ethylmaleinimid (NEM) zum Einsatz, während für die Reaktion mit den an der Endonukleaseposition gespaltenen Inteinfragmenten eine Markierung mittels des visualisierbaren Reagenzes 5-Iodacetamidfluorescein (5-IAF) genutzt wurde.

Modifikation mit N-Ethylmaleinimid

Zum Nachweis der Thiazolinringbildung bei der Reaktion von Pep**17** mit Doppelmutante **7b** wurden diese beiden Komponenten zunächst im Verhältnis 1 zu 2 gemischt (35 μM zu

70 μM) und für 24 h bei 25°C inkubiert. Die eigentliche Modifikation erfolgte durch Zugabe von 1,4 mM N-Ethylmaleinimid (NEM, ca. 10-facher Überschuss) und einer weiteren Inkubation bei 25°C für 2 h. Anschließend wurde die Reaktion mit 4 mM DTT gestoppt und alle Reaktionsprodukte mittels einer analytischen HPLC und MALDI-TOF-MS analysiert. Als Kontrolle diente der Reaktionsansatz ohne Konstrukt **7b**, bei dem lediglich das Peptid in Spleißpuffer bei 25°C für 24 h inkubiert wurde.

Modifikation mit 5-Iodacetamidfluorescein

Bei einer Analyse der Reaktivität der Cys1-Position im Endonuklease-gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein musste aufgrund der Größe der beteiligten Ausgangsproteine und Produkte auf eine MALDI-TOF Analyse verzichtet werden. Daher wurde in diesem Fall das interessante und einzige Cystein innerhalb der Int^N(1-104)-Sequenz (Cys50Ser-Substitution) mit Hilfe des Reagenzes 5-Iodacetamidfluorescein (5-IAF) modifiziert, um eine erfolgreiche Modifikation im SDS-Polyacrylamidgel visualisieren zu können.

Nach einer 24-stündigen Präinkubation von Konstrukt **21** (MBP-Int^N(1-104, G[-1]A)-His₆) mit Konstrukt **22** (MBP-Int^C(105-154,N154A)-Trx(S[+1]A)-His₆) bei 25°C mit äquimolaren Konzentrationen von je 6 μM , wurde das Alkylierungsreagenz 5-IAF im großen Überschuss (400 μM) zugegeben. Nach weiteren 2 h Inkubation bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mM DTT gestoppt und mittels SDS-PAGE analysiert. Als Kontrolle diente in diesem Zusammenhang die Reaktion des nicht Gly[-1]Ala-mutierten Konstrukts **20** mit Protein **22**, welche unter exakt gleichen Bedingungen durchgeführt wurde.

4.4.8 Reaktionen in ¹⁸O-isotopenmarkiertem Wasser

Um die Aufnahme von Wasser bei der Spleißreaktion von Pep**1** mit Protein **7** oder der Komplexbildungsreaktion von Pep**3** mit Mutante **7b** zu untersuchen, wurden diese beiden Reaktionen in einem Tris-Puffer mit ¹⁸O-isotopenmarkiertem Wasser durchgeführt. Die Herstellung dieses Puffers erfolgte durch die direkte Lösung von 50 mM Tris (3 mg) und 300 mM NaCl (87 mg) in 498 μL ¹⁸O-markiertem Wasser (Firma *ISOTECH*). Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 gelang mit 2 μL einer 37%-igen HCl-Lösung. Zur Kontrolle wurde ein nicht isotopenmarkierter Puffer mit normalem Wasser (¹⁶O) auf exakt die gleiche Weise hergestellt. Im eigentlichen Experiment wurden 18 μL des ¹⁸O-markierten Puffers, bzw. des Kontrollpuffers, vorgelegt. Anschließend wurden Glycerin (10%), TCEP (2 mM), das Int^C-Protein (11 μM , Konstrukt **7** oder **7b**) und das Int^N-Peptid (40 μM , Pep**1** oder Pep**3**)

zugegeben, was ein Gesamtvolumen von 25 μL ergab. Der Anteil des ^{18}O -Isotops in diesem Ansatz entsprach damit ca. 70%. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte bei 25°C für 24 h. Die abschließende Analyse der Produktbanden im SDS-Polyacrylamidgel gelang mittels eines tryptischen Verdaus und MALDI-TOF-MS (siehe Kapitel 4.6.2.1).

4.5 Kinetische Methoden

4.5.1 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Spleißreaktion

Die Geschwindigkeitskonstante des semisynthetischen *trans*-Proteinspleißens wurde für das Referenzsystem aus Pep3 (FI-KKESG-Int^N) und Protein 7 (Int^C-Trx-His₆) bestimmt. In diesem Zusammenhang wurde Pep3 in einem 5- bis 10-fachen Überschuss (210 bis 420 μM) mit Konstrukt 7 (42 μM) bei 25°C in Spleißpuffer umgesetzt. Die Probenentnahme (20 μL Reaktionsansatz + 10 μL 4xSDS-Probenpuffer) erfolgte in einem Zeitraum von 0 h bis 24 h, und die Analyse gelang mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Bei dieser Reaktion entstanden, neben dem Spleißprodukt (FI-KKESG-Trx-His₆, **8**) und dem gespleißten Inteinkomplex (**4** und **5**) auch das C-terminale Spaltprodukt (**9**) (siehe Abbildung 19). Die hierbei parallel ablaufenden und irreversiblen Reaktionen der Spleißproduktbildung (Gl. 2) und der C-terminalen Spaltung (Gl. 3) können mit den folgenden Reaktionsgleichungen beschrieben werden:



wobei P für Protein, Pep für Peptid, S für das Spleißprodukt, K für den Inteinkomplex, $k_{\text{Splei\ss}}$ für die Geschwindigkeitskonstante der Spleißreaktion, C für das C-terminale Spleißprodukt, I für das Int^C-Fragment und $k_{\text{C-Spaltung}}$ für die Geschwindigkeitskonstante der C-terminalen Spaltung steht. Da die folgenden kinetischen Betrachtungen für Gl. 2 und Gl. 3 vollkommen identisch sind, soll an dieser Stelle lediglich das zugrunde liegende Geschwindigkeitsgesetz zur Spleißreaktion (Gl. 2) betrachtet werden:

$$v = -\frac{d[\text{Pep}]}{dt} = -\frac{d[P]}{dt} = k_{\text{Splei\ss}} \cdot [\text{Pep}] \cdot [P] \quad (\text{Gl. 4})$$

wobei v der Reaktionsgeschwindigkeit, t der Zeit, $d[Pep]/dt$ der Änderung der Peptidkonzentration mit der Zeit und $d[P]/dt$ der zeitlichen Veränderung der Proteinkonzentration entspricht. Da sowohl bei der Spleißreaktion als auch bei der C-terminalen Spaltung das Ausgangsprotein **7** verbraucht wird, musste für eine Unterscheidung zwischen beiden Reaktionen der jeweilige prozentuale Anteil an diesem Verbrauch bestimmt werden. Dies gelang mit Hilfe einer densitometrischen Auswertung der Eduktbande (**7**), der Spleißproduktbande (**8**) und der Bande des C-terminalen Spaltprodukts (**9**) im Coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamidgel (siehe Kapitel 4.5.1).

Wie bereits beschrieben, wurde für die kinetische Analyse der Spleißreaktion Pep**3** stets im 5- bis 10-fachen Überschuss zu Konstrukt **7** eingesetzt. Unter diesen Bedingungen einer Reaktion pseudo-erster Ordnung kann die Anfangskonzentration des Peptids näherungsweise als konstant angesehen werden, womit das Geschwindigkeitsgesetz aus Gl. 4 vereinfacht dargestellt werden kann:

$$v = -\frac{d[P]}{dt} = k' \cdot [P] \quad (\text{Gl. 5})$$

$$\text{mit } k' = k_{\text{Spleißen}} \cdot [Pep]_0 \quad (\text{Gl. 6})$$

In diesem Fall entspricht $[Pep]_0$ der Konzentration des Peptids zum Zeitpunkt $t = 0$ h und k' der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung. Eine Integration von Gl. 5 in den Grenzen von $[P]_0$ bis $[P]_t$ ergibt folgende Beziehung:

$$[P]_t = [P]_0 \cdot e^{-k't} \quad (\text{Gl. 7})$$

Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ entspricht dem Zeitpunkt, an dem die Hälfte des Proteins umgesetzt worden ist. Daraus folgt:

$$[P] = \frac{[P]_0}{2} \quad \text{und} \quad t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k'} \quad (\text{Gl. 8})$$

Durch eine Auftragung der Abnahme der Konzentration des Ausgangsproteins $[P]$, ausgelöst nur durch die Spleißreaktion (die C-terminale Spaltung wird gesondert betrachtet) in Abhängigkeit von der Zeit, und durch die anschließende Angleichung mit Gl. 7, konnte die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung (k') für das semisynthetische *trans-*

Proteinspleißen ermittelt werden. Eine weitere Auftragung der auf diese Weise erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration mit anschließender linearer Regression führte schließlich zur Bestimmung der finalen Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{Spleißen}}$ (Steigung der Regressionsgerade, siehe Gl. 6). Die gleiche Prozedur unter der Betrachtung der Abnahme der Konzentration des Ausgangsproteins ausgelöst durch die C-terminale Spaltungsreaktion führte zur Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{C-Spaltung}}$.

Densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten im SDS-Polyacrylamidgel

Zur Bestimmung der Intensitäten der einzelnen Proteinbanden in Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen mussten die entsprechenden Gele zunächst in guter Qualität fotografiert werden (Digitalkamera „PowerShot G5“ der Firma *Canon*). Anschließend erfolgte die Bearbeitung der Bilder mit dem Grafikprogramm „Photoshop 7.0“ von *Adobe*, indem die einzelnen Edukt- und Produktbanden graphisch ausgeschnitten und in einem neuen Bild gespeichert wurden. Dabei wurde für jede Proteinbande auch eine analoge Hintergrundbande ausgeschnitten und gespeichert. Die somit erhaltenen Protein- und Hintergrundbanden konnten schließlich mit dem Programm „Scion Image“ (<http://www.scioncorp.com>) densitometrisch ausgewertet werden, indem das Absorptionsprofil einer jeden Bande durch Integration quantifiziert wurde. Die auf diese Weise erhaltenen Werte der Hintergrundbanden wurden von den jeweiligen Intensitäten der Produkt- und Eduktbanden abgezogen. Da die Anfangskonzentration des Proteins bekannt war, konnte anhand der Abnahme der Eduktbande zu jedem Zeitpunkt der entsprechende Gesamtumsatz der Reaktion berechnet werden. Um den prozentualen Anteil der Spleißreaktion, bzw. der C-terminalen Spaltung an diesem Gesamtumsatz zu ermitteln, wurden auch die Intensitäten dieser beiden Produktbanden bestimmt und in Relation zueinander gesetzt. Da die Bandenintensität im Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel zur Proteingröße in etwa proportional ist, musste mit Hilfe eines Korrekturfaktors, bestehend aus dem Quotienten der Masse von Spleißprodukt und C-terminalem Spaltprodukt, die Bandenintensitäten rechnerisch angepasst werden. Erst jetzt konnte das relative Verhältnis von Spleißen zu Hydrolyse bestimmt und mit Hilfe der Information der Eduktabnahme schließlich auch die absoluten Ausbeuten berechnet werden.

4.5.2 Bestimmung der kinetischen Parameter der Inteinfragment-Assoziation

4.5.2.1 Theoretischer Hintergrund zur Fluoreszenz-Anisotropie

Die Inteinfragment-Assoziation wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Messungen der zeitlichen Veränderung der Fluoreszenz-Anisotropie bestimmt. Diese Untersuchungen konnten für alle synthetischen Int^N-Peptide aufgrund des N-terminal eingeführten Carboxyfluorescein-Moleküls durchgeführt werden.

Allgemein führt die Anregung von Fluorophoren mit linear polarisiertem Licht oftmals zur Emission von ebenfalls polarisierten Photonen. Diese Erscheinung, die die Richtungsabhängigkeit einer Reaktion beschreibt, wird Fluoreszenz-Anisotropie genannt und ist definiert als:

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}} \quad (\text{Gl. 9})$$

wobei I_{\parallel} der Fluoreszenzintensität parallel und I_{\perp} der Fluoreszenzintensität senkrecht zum eingestrahlten Licht entspricht. Ist ein Fluorophor nicht fest im Raum angeordnet, sondern in der Reaktionslösung frei beweglich, so wird die Fluoreszenz-Anisotropie durch die freie Drehbarkeit des Fluorophors in Lösung, d.h. durch die Rotationsdiffusionskonstante, beeinflusst. Auch die Fluoreszenzlebensdauer, also die Zeit zwischen der Absorption und Emission eines Photons, spielt eine entscheidende Rolle. Die Abhängigkeit der Anisotropie von der Rotationskorrelationszeit ϕ und der Fluoreszenzlebensdauer τ wird in der sogenannten Perrin-Gleichung beschrieben:

$$\frac{A_0}{A} = 1 + \frac{\tau}{\phi} \quad (\text{Gl. 10})$$

(mit A_0 = intrinsische Fluoreszenz-Anisotropie des unbeweglichen Fluorophors). Da sowohl ϕ als auch τ größer oder gleich 0 sein müssen, kann laut Gl. 10 die Fluoreszenz-Anisotropie A nur Werte zwischen 0 und A_0 annehmen.

4.5.2.2 Theoretischer Hintergrund zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d

Der Komplexbildungsreaktion der Inteinfragmente dieser Arbeit liegt im einfachsten Fall folgende reversible Reaktionsgleichung zugrunde:



mit P = Protein, Pep = Peptid, K = Komplex, k_{on} = Geschwindigkeitskonstante der Komplexassoziation und k_{off} = Geschwindigkeitskonstante der Komplexdissoziation. Die Dissoziationskonstante K_d kann mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{[P] \cdot [Pep]}{[K]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} = K_d \quad (\text{Gl. 12})$$

Nach Massenerhaltung gilt:

$$[Pep]_0 = [Pep] + [K] \quad \text{und} \quad [P]_0 = [P] + [K] \quad (\text{Gl. 13})$$

(mit $[Pep]_0$ und $[P]_0$ = Anfangskonzentration an Peptid und Protein, $[Pep]$ und $[P]$ = Konzentration an freiem Peptid und Protein und $[K]$ = Konzentration des gebildeten Komplexes). Aus dem Massenwirkungsgesetz (Gl. 12) und der Massenerhaltung (Gl. 13) erhält man folgende Beziehung:

$$K_d = \frac{([P]_0 - [K]) \cdot ([Pep]_0 - [K])}{[K]} \quad (\text{Gl. 14})$$

Ausmultiplizieren und Auflösen von Gl. 14 nach $[K]$ ergibt die quadratische Gl. 15:

$$[K] = \frac{[P]_0 + [Pep]_0 + K_d}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[P]_0 + [Pep]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [P]_0 \cdot [L]_0} \quad (\text{Gl. 15})$$

Physikalisch sinnvoll ist hierbei nur die Lösung mit dem negativen Vorzeichen vor dem Wurzelterm. Die zeitliche Änderung der Fluoreszenz-Anisotropie während der Komplexbildung ist proportional zum Bindungsgrad, der wiederum durch das Verhältnis von $[K]$ zu $[P]_0$ gegeben ist. Die Proportionalitätskonstante ist hierbei die maximale Änderung der Fluoreszenz-Anisotropie (ΔA_{\max}), die nur unter Sättigungsbedingungen zu beobachten ist:

$$\Delta A = \Delta A_{\max} \cdot \frac{[K]}{[P]_0} \quad (\text{Gl. 16})$$

(mit ΔA = gemessene Änderung der Fluoreszenz-Anisotropie und ΔA_{\max} = maximale Änderung der Fluoreszenz-Anisotropie bei Sättigung). Die gemessene Fluoreszenz-Anisotropie A einer Reaktion setzt sich zusammen aus der Anisotropie des freien fluoreszierenden Liganden (A_{\min}) und der Änderung der Fluoreszenz-Anisotropie durch Proteinzugabe (ΔA). Zusammen mit Gl. 16 ergibt sich:

$$A = A_{\min} + (A_{\max} - A_{\min}) \cdot \frac{[K]}{[P]_0} \quad (\text{Gl. 17})$$

Aus Gl. 15 und 17 erhält man die folgende Formel zur Berechnung des K_d -Werts:

$$A = A_{\min} + (A_{\max} - A_{\min}) \cdot \frac{([P]_0 + [Pep]_0 + K_d) - \sqrt{([P]_0 + [Pep]_0 + K_d)^2 - 4[P]_0 \cdot [Pep]_0}}{2[P]_0} \quad (\text{Gl. 18})$$

wobei A die gemessene Fluoreszenz-Anisotropie, A_{\min} die Fluoreszenz-Anisotropie des freien Peptids, A_{\max} die maximale Fluoreszenz-Anisotropie bei Sättigung, $[P]_0$ die Gesamtkonzentration des Proteins, $[Pep]_0$ die Gesamtkonzentration des Peptids und K_d die Dissoziationskonstante darstellt. Eine Auftragung der im Gleichgewichtszustand gemessenen Fluoreszenz-Anisotropie A in Abhängigkeit von den verschiedenen genutzten Proteinkonzentrationen $[P]_0$, bei einer konstanten Peptidkonzentration $[Pep]_0$ von 1 μM , liefert somit nach Angleichung mit Gl. 18 den gesuchten K_d -Wert.

4.5.2.3 Experimentelle Durchführung der Messungen zur Fluoreszenz-Anisotropie

Die zeitliche Veränderung der Fluoreszenz-Anisotropie in den Reaktionsansätzen zur Inteinfragment-Assoziation wurde mit Hilfe eines Fluoreszenz-Spektrometers (SafireII) der Firma *Tecan* bestimmt. Fast alle Carboxyfluorescein-tragenden Peptide dieser Arbeit (Übersichtstabelle 12 im Anhang) wurden hierfür mit der spleißinaktiven Tripelmutante **7c** umgesetzt. Diese Mutante kann aufgrund von drei eingeführten Punktmutationen (H73A, N154A und S[+1]A) lediglich die Komplexbildung zwischen Int^N und Int^C katalysieren, während alle folgenden Reaktionsschritte des Spleißmechanismus inhibiert sind. Als Reaktionsgefäße dienten Mikrotiterplatten der Firma *Perkin Elmer* (OptiPlate-384 F, „flat-bottom-black“). Das finale Reaktionsvolumen betrug 50 μL pro „well“. Die einzelnen Messpunkte wurden im Abstand von ca. 60 s und über einen Zeitraum von 22 h aufgezeichnet. Durchgeführt wurden die Reaktionen bei 30°C, da dies, aufgrund von fehlenden Kühlungsmöglichkeiten, die niedrigste konstant einstellbare Reaktionstemperatur darstellte. Die genutzte Anregungswellenlänge des Carboxyfluoresceins betrug 470 nm, während die Emission bei einer Wellenlänge von 542 nm gemessen wurde. Um eine Evaporation der Reaktionsvolumina zu vermeiden, wurden alle Reaktionsansätze direkt nach der Mischung aller Komponenten mit einer selbstklebenden und transparenten Plastikfolie der Firma *Biacore* luftdicht verschlossen. In einer typischen Versuchsreihe wurden das fluoreszente Peptid (stets 1 μM) und Protein **7c** miteinander umgesetzt, wobei acht verschiedene Proteinkonzentrationen zwischen 0,05 und 30 μM verwendet wurden. Zusätzlich wurde in einem neunten Reaktionsansatz das Peptid (1 μM) ohne Proteinzugabe lediglich in Spleißpuffer (siehe Kapitel 3.6) inkubiert. Der hierbei auftretende Verlauf der Fluoreszenz-Anisotropie des freien Peptids wurde von jeder erhaltenen Messkurve mit Proteinzugabe subtrahiert. Im Fall einer nur schwachen Assoziation von Peptid und Protein (für Pep**4**, Pep**8**, Pep**14** und Pep**16**) wurden Proteinkonzentrationen im Bereich von 0,5 bis 75 μM verwendet. Durch die Auftragung der maximalen Fluoreszenz-Anisotropie gegen die Proteinkonzentration, und durch die anschließende Angleichung mit Gl. 18, konnte die Dissoziationskonstante eines jeden Peptids ermittelt werden (für Übersicht aller Peptide siehe Abbildung 52 im Anhang). Die in Tabelle 12 im Anhang wiedergegebenen K_d -Werte entsprechen dem Mittelwert aus mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Messreihen.

Auch die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{on} gelang mit Hilfe der Messdaten zur Fluoreszenz-Anisotropie. Da es sich bei der Komplexbildungsreaktion um eine

reversible Gleichgewichtsreaktion handelt (siehe Gl. 11), kann der Zusammenhang zwischen k_{on} und k_{off} unter den Bedingungen einer Reaktion pseudo-erster Ordnung über die folgende Gleichung wiedergegeben werden:

$$k'_{on} = k_{off} + k_{on}[P] \quad (\text{Gl. 19})$$

(mit k'_{on} = Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung, k_{off} = Geschwindigkeitskonstante der Komplexdissoziation, k_{on} = Geschwindigkeitskonstante der Komplexassoziation und $[P]$ = Proteinkonzentration). Demnach konnte für alle Reaktionsansätze mit einem deutlichen Überschuss an Protein **7c** (mindestens 5 μM) der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz-Anisotropie durch Gl. 7 angeglichen, und somit die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung (k'_{on}) bestimmt werden. Eine Auftragung dieser ermittelten k'_{on} -Werte in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration konnte mit Gleichung 19 angeglichen werden. Die Steigung der erhaltenen Regressionsgeraden entsprach der finalen Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung (k_{on}), während der Y-Achsenabschnitt k_{off} darstellte.

4.5.2.4 Quantenausbeute des Fluorophors in gebundener und freier Form

Veränderungen in der Fluoreszenz-Anisotropie einer Assoziationsreaktion können theoretisch auf eine globale oder lokale Veränderung der freien Drehbarkeit des enthaltenen Fluorophors hinweisen, aber auch eine Veränderung der Quantenausbeute des Fluorophors kann einen Effekt auf die Fluoreszenz-Anisotropie haben. Jeder Anisotropie-Wert setzt sich additiv aus der Fluoreszenz-Anisotropie der freien und der gebundenen Form eines Fluorophors zusammen. Tritt also eine Veränderung in der Fluoreszenzintensität zwischen diesen beiden Formen auf, muss dies mittels einer mathematischen Gewichtung bei der Auswertung der kinetischen Daten berücksichtigt werden.

Um festzustellen, ob eine Veränderung der Quantenausbeute auch bei der Inteinfragment-Assoziation dieser Arbeit auftrat, wurde der Verlauf der totalen Fluoreszenzintensität der Referenzreaktion (Pep3 mit Protein **7c**) mit dem Verlauf eines nicht komplexierenden Peptids (Pep6 mit Protein **7c**) bei vier verschiedenen Proteinkonzentrationen verglichen (siehe Abbildung 50 im Anhang). Der hierbei auftretende Fluoreszenzintensitätsverlust (hauptsächlich ausgelöst durch „Photobleaching“) war für die Referenzreaktion und die Negativkontrolle vergleichbar, d.h. es konnte keine signifikante

Veränderung der Quantenausbeute zwischen der freien und der gebundenen Form des Fluorophors detektiert werden.

Eine weitere Kontrolle in diesem Zusammenhang war die Umsetzung des Referenzpeptids Pep3 (1 μM) mit zwei Kontrollproteinen, welche kein Int^C-Fragment enthielten und daher nicht mit der Int^N-Sequenz von Pep3 assoziieren konnten. Hierbei handelte es sich um das Rinderserumalbumin (BSA) und um Konstrukt 1 (Strep-Trx-Int^N). Wie in Abbildung 51A im Anhang dargestellt, war der Verlauf der totalen Fluoreszenzintensität der Negativkontrollen mit der Referenzreaktion vergleichbar. Im Gegensatz hierzu zeigte die Analyse der Fluoreszenz-Anisotropie, dass lediglich mit Protein 7c eine Komplexbildung auftrat (siehe Abbildung 51B im Anhang).

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der beschriebenen Experimente gezeigt werden, dass ein Unterschied in der totalen Fluoreszenzintensität des Fluorophors in freier und gebundener Form vernachlässigt werden kann.

4.6 Analytische Methoden

4.6.1 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Mit Hilfe des 1100 HPLC-Systems der Firma *Agilent* wurden verschiedene analytische Untersuchungen angestellt. In einer ersten Anwendung wurde das System zur Entsalzung von Protein- und Peptidlösungen genutzt, um anschließend ESI-Massenspektrometrie betreiben zu können (siehe Kapitel 4.6.3). In diesem Zusammenhang diente ddH₂O mit 0,1% (v/v) Ameisensäure als Puffer A, Acetonitril mit 0,1% (v/v) Ameisensäure als Puffer B und eine „Zorbax 300SB-C8-Säule“ der Firma *Agilent* als stationäre Phase. Der zur Peptid- oder Protein-Elution verwendete Gradient von 0% auf 100% Puffer B dauerte ca. 10 min.

Weiterhin fand die analytische HPLC Anwendung bei der Analyse der synthetisierten und gereinigten Peptide. Hierbei diente die „Eclipse XDB-C18-Säule“ der Firma *Agilent* als stationäre Phase und als Puffer wurden ddH₂O (A) und Acetonitril (B) mit jeweils 0,1% (v/v) TFA verwendet. Der in diesem Fall genutzte Gradient von 0% bis 100% Puffer B verlief über einen Zeitraum von 30 Minuten.

Ebenfalls genutzt wurde die analytische HPLC zur Analyse der Spleiß- und der Komplexbildungsreaktionen. Die entsprechenden Reaktionsansätze wurde nach 24 h Inkubation bei 25°C direkt auf eine „Zorbax 300SB-C3 Säule“ der Firma *Agilent* aufgetragen (30 bis 50 μL). Die Auftrennung der einzelnen Komponenten im Reaktionsansatz erfolgte mit Hilfe von Puffer A (0,1% TFA (v/v) in ddH₂O) und Puffer B (0,1% TFA (v/v) in Acetonitril)

und einem Gradienten aus Puffer B von 0% auf 60% innerhalb von 45 Minuten. Die abschließende Identifikation der einzelnen Signale wurde mittels MALDI-TOF-MS umgesetzt.

4.6.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die Reaktionsansätze zum Proteinspleißen und zur Intein-Komplexbildung in Teil 5.2 und 5.3 dieser Arbeit wurden durch MALDI-TOF-Messungen (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* und *Time of Flight*) analysiert. Auch die Analyse aller synthetisierten und gereinigten Peptide erfolgte mit dieser Methode. Genutzt wurde das Massenspektrometer „Autoflex 2“ der Firma *Bruker Daltonics* im positiven Ionendetektions-Modus. Als Matrix zur Analyse von Peptiden diente eine gesättigte Lösung aus 4-Hydroxy- α -Cyanozimtsäure (CHCA) in 50% Acetonitril, 50% ddH₂O und 0,1% TFA. Bei der Arbeit mit Proteinen wurden dagegen gesättigte Lösungen von Sinapinsäure (SA) oder Dihydroxybenzoesäure (DHB) im gleichen Lösungsmittel verwendet. Die Kalibrierung der Peptide erfolgte mit dem „Peptide Standard I“ der Firma *Bruker Daltonics*, während Proteine mit dem „Protein Calibration Standard I“ kalibriert wurden.

4.6.2.1 Tryptischer Verdau von Proteinbanden

Im Rahmen der mechanistischen in ¹⁸O-isotopenmarkiertem Wasser durchgeführten Untersuchung (Kapitel 5.3.5) wurden Edukt- und Produktproteine mittels eines tryptischen Verdau analysiert. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Coomassie-gefärbten Proteinbanden aus einem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten, durch Zugabe von 300 μ L Waschlösung (200 mM Ammoniumhydrogencarbonat in 50% Acetonitril) 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert, bei 600 rpm in einem Thermoschüttler entfärbt und anschließend gefriergetrocknet. Für den Trypsinverdau wurde das getrocknete Gelstück mit ca. 10-15 μ L Trypsinlösung (0,02 μ g/ μ L Trypsin, 40 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 10% Acetonitril, pH 8,1) 45 min inkubiert. Ein eventuell noch vorhandener Überstand wurde entfernt, und das in Trypsinlösung getränkte Gelstück wurde über Nacht (16-18 h) bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die bei der Trypsinierung entstandenen Peptidfragmente durch Zugabe von 15 μ L Diffusionslösung (10% Acetonitril, 1% TFA) im Ultraschallbad eluiert (45 min, RT) und schließlich massenspektrometrisch durch MALDI-TOF analysiert. Hierbei konnten die einzelnen Peptidmassen anhand berechneter Peptidfragmente identifiziert werden (<http://expasy.org/tools/peptide-mass.html>).

4.6.3 ESI-Massenspektrometrie

Die Reaktionsansätze zum *trans*-Proteinspleißen aus Teil 5.1 dieser Arbeit wurden neben der SDS-PAGE zusätzlich auch durch ESI-Massenspektrometrie (Elektronenspray Ionisation) analysiert. Auf diese Weise konnten sowohl die enthaltenen Ausgangsproteine und Peptide, als auch die entstandenen Produkte verifiziert werden. Für diese Messungen wurden die Proteinlösungen (100 µL) zunächst mit Hilfe eines 1100 HPLC-Systems der Firma *Agilent* mit einer 2,1 x 50 mm Zorbax 300SB-C8-Säule (*Agilent*) entsalzt. Die Proteinmassen wurden anschließend „on-line“ mittels ESI-TOF-MS durch ein „QStar Pulsar i Time-Of-Flight“ Massenspektrometer der Firma *Applied Biosystems* detektiert.

4.6.3.1 ESI-MS/MS und ESI-MS³

Der bei der Umsetzung von Pep17 (Fl-KKESA-Int^N) und Doppelmutante 7b (Int^C(N154A)-Trx(S[+1]A)-His₆) gebildete Thiazolinring wurde mit Hilfe von ESI-MS/MS- und ESI/MS³-Messungen eindeutig identifiziert. Weiterhin konnte mittels der Fragmentierung von Pep17 vor und nach Ringschluss die exakte Lokalisation des Thiazolins innerhalb der Peptidkette bestimmt werden. Für diese Untersuchung mussten die beiden Peptidformen (Pep17 mit und ohne Thiazolin) zunächst mittels eines analytischen 1100 HPLC-Systems (*Agilent*) und einer Zorbax-C18-Säule (*Agilent*) entsalzt werden. Die hierbei verwendeten Puffer A (ddH₂O) und B (Acetonitril) enthielten 0,1% Ameisensäure. Da der Thiazolinring unter diesen sauren Bedingungen hydrolysiert, mussten die ESI-Messungen möglichst direkt im Anschluss an die HPLC an einem LTQ-Massenspektrometer (*Thermo Fisher Scientific*) im positiven Ionendetektions-Modus durchgeführt werden.

5 Ergebnisse

Gespaltene Inteine stellen ein bereits häufig verwendetes und immer wichtiger werdendes biochemisches Werkzeug dar, mit dessen Hilfe zwei getrennt voneinander generierte Polypeptide über eine native Peptidbindung kovalent miteinander verknüpft werden können. Da gespaltene Inteine nur sehr vereinzelt in der Natur vorkommen, wurden die meisten bislang verwendeten Inteine durch eine künstliche Spaltung erzeugt. In diesem Zusammenhang ist die Darstellung und Etablierung neuer artifiziell gespaltener Inteine, welche eine Spleißreaktion *in trans* unter veränderten oder verbesserten Bedingungen ermöglichen, von großem Interesse.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmals die Funktionalität eines an Position 11 künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Inteins *in vitro* überprüft und etabliert werden. Die Innovation dieses neuen gespaltenen Inteins liegt im einfachen synthetischen Zugang des lediglich 11 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Inteinfragments (Int^{N}). Daher konnte erstmals ein Fusionskonstrukt aus Int^{N} zusammen mit einer kurzen N-Exteinsequenz (Ex^{N}) mittels Festphasenpeptidsynthese synthetisiert werden, während eine Fusion aus dem C-terminalen Inteinfragment (Int^{C}) und einem beliebigen Zielprotein (Ex^{C}) durch rekombinante Genexpression generiert wurde.

In einem ersten Teil sollte die generelle Anwendbarkeit eines solchen semisynthetischen Ansatzes zur N-terminalen Modifikation von Proteinen etabliert werden. In diesem Zusammenhang sollten verschiedene Proteine modifiziert, im präparativen Maßstab dargestellt und gereinigt werden, um sie anschließend auf ihre enzymatische Aktivität hin zu untersuchen.

Der zweite Teil befasst sich mit der Optimierung und Charakterisierung des gespaltenen Inteins. Hierbei wurde die Funktionalität und Stabilität des Int^{C} -Fragments durch Variationen der Sequenzlänge evaluiert, sowie die minimale Größe der Int^{N} -Sequenz experimentell ermittelt. Außerdem wurden die für eine Inteinfragment-Assoziation essentiellen Aminosäuren im Int^{N} identifiziert und die kinetischen Parameter der Spleißproduktbildung sowie der $\text{Int}^{\text{N}}/\text{Int}^{\text{C}}$ -Komplexbildung bestimmt.

Im dritten Teil wurde das semisynthetische System genutzt, um mechanistische Studien am Intein durchzuführen. Hierzu gehörten die Identifizierung eines Thiazolin- und eines Lactonrings als Nebenprodukte im Spleißmechanismus, genauso wie der Einbau unnatürlicher Aminosäurebausteine innerhalb und angrenzend zur Int^{N} -Sequenz. Zusätzlich

wurde die Aufnahme von Wassermolekülen während der Spleißreaktion mit Hilfe einer in ^{18}O -isotopenmarkiertem Wasser durchgeführten Studie untersucht.

5.1 Teil 1: Etablierung einer neuen semisynthetischen Methode zur N-terminalen Modifikation von Proteinen

5.1.1 Vorversuche mit einem rekombinanten System

Die Schlüsselfrage zu Beginn dieser Arbeit war, ob das von Sun *et al.* [67] mittels einer genetischen Studie identifizierte und an Position 11 gesplante *Ssp* DnaB-Intein auch *in vitro* aus den beiden Fragmenten Int^{N} (1-11) und Int^{C} (12-154) rekonstituiert werden kann, und anschließend die *trans*-Spleißreaktion katalysiert. Dies war zunächst durchaus fragwürdig, da sowohl die Gegenwart von endogenen Chaperonen als auch die Koexpression der komplementären Fragmente zu einer korrekten Faltung *in vivo* beigetragen haben könnten. Damit wäre bei den isolierten Fragmenten eine größere Tendenz zur Aggregation und zur fehlerhaften Rekonstitution des Inteins zu erwarten, wie es zuvor bereits für verschiedene gesplante Proteine und Inteine beobachtet wurde [53, 160, 161].

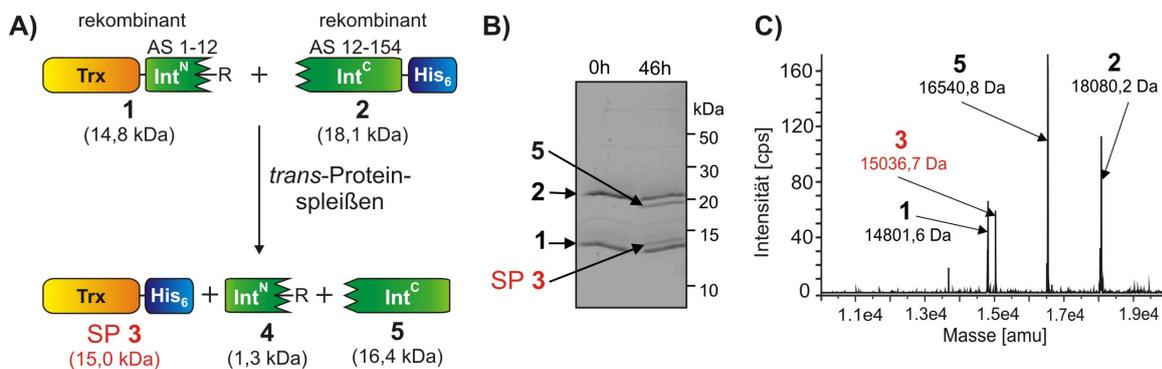


Abbildung 17. Rekonstitution des gesplante Inteins im rekombinanten System. Die beiden Fusionsproteine **1** und **2** wurden getrennt voneinander in *E. coli* exprimiert und chromatographisch gereinigt. Das *trans*-Proteinspleißen wurde durch Mischen beider Proteine gestartet (jeweils 12 μM). **A)** Übersichtsschema der Reaktion. **B)** Analyse der Reaktion mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. **C)** ESI-TOF-MS des Reaktionsansatzes nach 40 h. Die berechneten Massen $[\text{M}+\text{H}]^+$ (in Da) sind: **1**: 14799,9; **2**: 18079,5; **3**: 15036,0; **4**: 1321,5; **5**: 16540,0. (SP = Spleißprodukt, Trx = Thioredoxin, R = Arginin)

In einem ersten Modellversuch sollten zunächst beide Inteinfragmente auf rekombinante Weise generiert werden. Hierfür wurden die zwei Intein-Fusionsproteine $\text{Trx-Int}^{\text{N}}$ (**1**) und $\text{Int}^{\text{C-His}_6}$ (**2**) kloniert, die als N-Extein Thioredoxin (Trx) und als C-Extein eine kurze Polypeptidsequenz mit einem Hexahistidin-Tag (His_6) besaßen (Abbildung 17A).

Konstrukt **1** enthielt aufgrund der verwendeten Klonierungsstrategie (Einführung einer *Xba*I-Schnittstelle) neben den Aminosäuren 1-11 des *Ssp* DnaB Inteins (Int^N) zusätzlich die Aminosäuren Serin und Arginin am C-terminalen Ende. Dabei ist anzumerken, dass das auf diese Weise eingeführte Ser12 der nativen Aminosäure im *Ssp* DnaB Intein entsprach und somit das Int^N-Fragment in diesem Fall aus den ersten 12 Aminosäuren des *Ssp* DnaB-Inteins aufgebaut war. Außerdem wurden zwei bzw. drei native Reste als flankierende Aminosäuren an der N- bzw. C-terminalen Spleißstelle eingeführt (Gly[-1], Ser[-2] und Ser[+1], Ile[+2], Glu[+3]). Nach der separaten Expression von **1** und **2** in *E. coli* konnten beide Proteine aus den löslichen Fraktionen gereinigt werden. Inkubation von **1** und **2** in äquimolaren Mengen (je 12 µM) in Spleißpuffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% Glycerin) bei pH 7,0 und 25°C führte zum erwarteten Spleißprodukt **3**, welches mit SDS-PAGE und ESI-TOF-MS nachgewiesen wurde (Abbildung 17B und 17C). Dabei konnte eine maximale Spleißausbeute von ca. 25% nach 40 h Inkubation durch eine densitometrische Analyse der Bandenintensitäten im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel ermittelt werden (siehe Kapitel 4.5.1). Weiterhin konnte auch mit einem alternativen N-Extein (Maltose-bindendes Protein) sowie einem anderen C-Extein (Thioredoxin) die entsprechenden Spleißprodukte detektiert werden, dessen Ausbeuten ebenfalls in der Größenordnung von 15 - 30% lagen (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse machten zum Einen eine erstaunlich gute Löslichkeit und proteolytische Stabilität des C-terminalen Inteinfragments deutlich, zum Anderen lieferten sie den Beweis, dass die Rekonstitution der rekombinanten Fragmente zum aktiven Intein auch *in vitro* ohne die Notwendigkeit weiterer Renaturierungsschritte stattfinden konnte.

5.1.2 Etablierung des semisynthetischen Systems

Aufbauend auf den Ergebnissen mit rekombinant generierten Inteinfragmenten sollte in einem zweiten Schritt das System im semisynthetischen Kontext getestet werden. Hierfür wurde das rekombinante Konstrukt **1** gegen ein mittels Festphasenpeptidsynthese generiertes Peptid (Pep**1**) ersetzt. Dabei entsprach die gesamte Aminosäuresequenz des Peptids exakt den letzten 18 Aminosäuren von Konstrukt **1**, d.h. es enthielt fünf N-Extein Aminosäuren (SEFSG), das N-terminale Inteinfragment Int^N(1-12), sowie den zusätzlichen Argininrest am C-Terminus. Abweichend von Konstrukt **1** enthielt Pep**1** die chemische Modifikation 5,6-Carboxyfluorescein (Fl), welche über eine Amidbindung kovalent am N-Terminus des Peptids gebunden war (Abbildung 18A). Dieses Pep**1** wurde zunächst käuflich erworben und zu

einem späteren Zeitpunkt mittels Fmoc-basierter Festphasenpeptidsynthese selber synthetisiert. In diesem ersten Teil 5.1 wurde bei allen Pep1-einschließenden Experimenten ausschließlich das käuflich erworbene Produkt verwendet.

Für einen semisynthetischen Ansatz wurden Pep1 (40 μM) und Konstrukt 2 (20 μM) in Spleißpuffer bei 25°C inkubiert, was zur Bildung des erwarteten Spleißprodukts 6 führte. Dieses konnte unter UV-Licht mittels eines 20%-igen SDS-Polyacrylamidgels (Abbildung 18B) sowie durch ESI-TOF-MS nachgewiesen werden (Abbildung 18C). Wie aus Abbildung 18B zu entnehmen, wurde Konstrukt 2 nach 48 h zu über 90% in Produkt 5 (freigesetzte Int^C-Fragment) umgewandelt. Im Vergleich zum rekombinanten Ansatz konnte damit ein deutlich verbesserter Umsatz des Reaktanten 2 erzielt werden (Vergleich Abbildung 17B und 18B). Eine prozentuale Angabe der Bildung von Spleißprodukt 6 konnte nicht ermittelt werden, da dieses aufgrund seiner geringen Größe (2,4 kDa) lediglich unter UV-Licht, aber nicht durch eine Coomassie-Anfärbung detektierbar war.

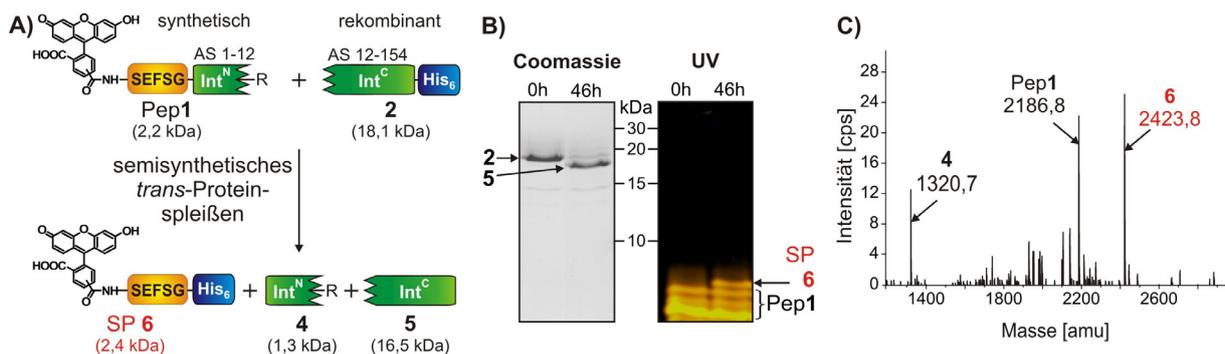


Abbildung 18. Darstellung eines semisynthetischen fluoreszierenden Peptids. Die Spleißreaktion des synthetischen Peptids Pep1 (40 μM) und des rekombinanten Fusionsproteins 2 (20 μM) lieferte das fluoreszierende Spleißprodukt 6. **A)** Übersichtsschema der Reaktion. **B)** Analyse der Reaktion mittels SDS-PAGE durch Coomassie-Färbung (links) und UV-Illumination (rechts). Das Spleißprodukt 6 konnte lediglich unter UV-Licht detektiert werden **C)** ESI-TOF-MS des Reaktionsansatzes nach 46 h (im Bereich von 1200 bis 2900 Da). Die berechneten Massen $[M+H]^+$ (in Da) sind: Pep1: 2187,1; 2: 18079,5; 4: 1321,5; 5: 16540,0; 6: 2423,3. (SP = Spleißprodukt, Trx = Thioredoxin, R = Arginin)

Im nächsten Schritt sollte das Potential der Methode zur N-terminalen Modifikation eines größeren Zielproteins getestet werden. Das erste hierfür verwendete Modellprotein war die Oxidoreduktase Thioredoxin (Trx) aus *E. coli*, welche in dem Fusionsprotein Int^C-Trx-His₆ (7) das C-Extein repräsentiert (Abbildung 19A). Nach Expression in *E. coli* und Reinigung mittels Ni²⁺-NTA-Chromatographie aus der löslichen Fraktion, wurde die Spleißreaktion durch Zugabe von Pep1 unter den bereits beschriebenen Bedingungen gestartet. Das gewünschte semisynthetische Spleißprodukt (8), sowie die beiden freigesetzten Inteinfragmente Int^N (4) und Int^C (5) konnten anschließend mittels SDS-PAGE und ESI-TOF-

MS eindeutig identifiziert werden (Abbildung 19B und 19C). Weiterhin wurde ein Nebenprodukt der Spleißreaktion detektiert (**9**), welches durch eine frühzeitige Asparaginzyklisierung und der damit verbundenen Abspaltung des C-Exteins entstand. Die Ausbeute an Spleiß- bzw. C-terminalem Spaltprodukt betrug nach 48 h Inkubation bei 25°C jeweils ca. 45% (Abbildung 19B). Die Bildung eines solchen Nebenproduktes konnte bei den zuvor gezeigten Reaktionen mit Konstrukt **2** (Abbildung 17 und 18) nicht nachgewiesen werden. Allerdings war die Detektion des in diesem Fall lediglich 1,5 kDa großen Spaltproduktes mit MALDI-TOF-MS und SDS-PAGE problematisch, so dass ein Auftreten der C-terminalen Spaltung auch nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden kann.

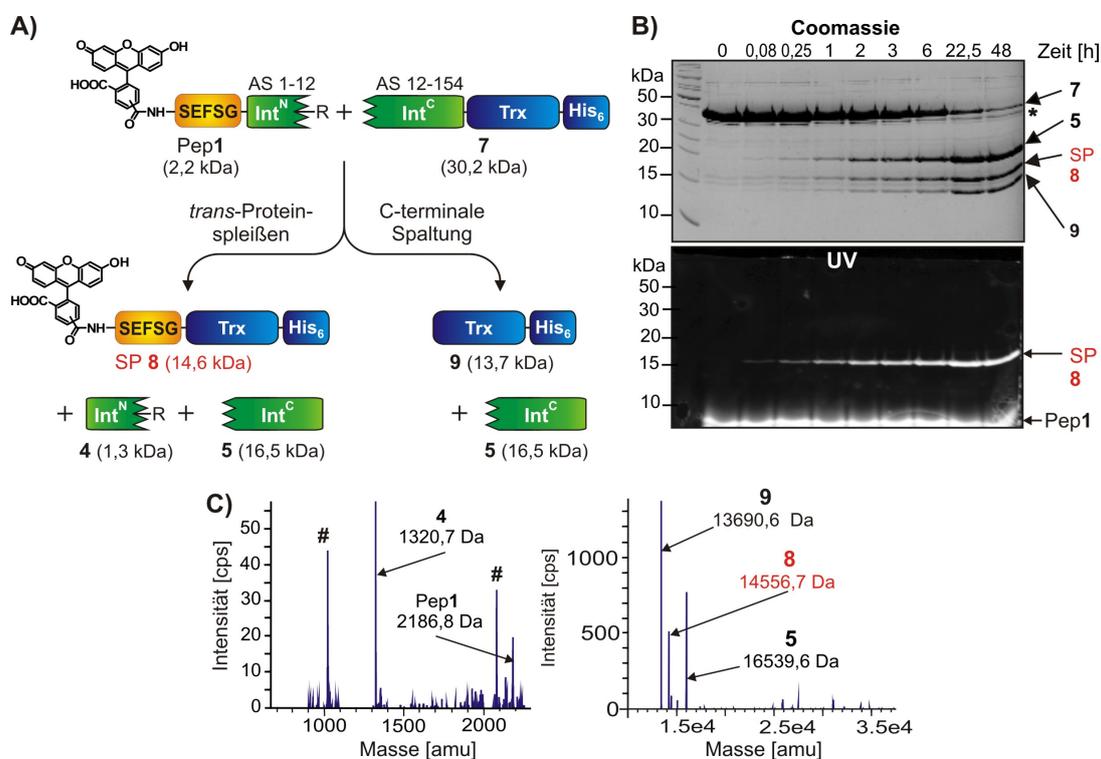


Abbildung 19. Darstellung eines semisynthetischen fluoreszierenden Proteins. **A)** Die Spleißreaktion des synthetischen Peptids Pep1 (62 μ M) und des Fusionsproteins 7 (62 μ M) lieferte als Produkt ein N-terminal mit Carboxyfluorescein modifiziertes Thioredoxin (**8**). Zusätzlich trat durch eine C-terminale Spaltungsreaktion die Bildung des Nebenproduktes **9** auf. **B)** Zeitlicher Reaktionsverlauf, verfolgt mit SDS-PAGE und Coomassie-Anfärbung (oben) oder unter UV-Licht (unten) (* = Proteinverunreinigung). **C)** ESI-TOF-MS des Reaktionsgemisches nach 48 h. (# = Verunreinigungen). Die berechneten Massen [M+H]⁺ (in Da) sind: Pep1: 2187,1; **4**: 1321,5; **5**: 16539,9; **7**: 30213,4; **8**: 14557,0; **9**: 13691,5. (SP = Spleißprodukt, Trx = Thioredoxin, R = Arginin)

5.1.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Basierend auf der semisynthetischen Reaktion von Pep1 und Protein 7 wurden verschiedene Reaktionsparameter wie Temperatur, pH-Wert, Glycerin- oder Salzgehalt variiert, um auf diese Weise die Reaktionsbedingungen zu optimieren.

In einem ersten Experiment wurde das *trans*-Proteinspleißen bei vier verschiedenen Temperaturen in einem Bereich von 4°C bis 37°C in Spleißpuffer (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% Glycerin, 2 mM DTT, pH 7,0) durchgeführt und mittels SDS-PAGE analysiert. In Abbildung 20A sind die durch densitometrische Analyse ermittelten Ausbeuten an Spleißprodukt **8** und C-terminaler Spaltung **9** nach 24 h Inkubation graphisch dargestellt. Aus den Daten ist ersichtlich, dass die Bildung des Spleißprodukts **8** mit steigender Temperatur zunahm (4°C = 17% und 15°C = 35%) und ein Maximum von 40% bei 25°C erreichte. Ein weiterer Temperaturanstieg auf 37°C verringerte die Spleißausbeute auf lediglich 20%. Das Verhältnis von Spleißen zu C-terminaler Spaltung blieb dabei in dem Temperaturbereich von 4°C bis 25°C konstant bei ca. 1:1, während sich bei 37°C die C-terminale Spaltung im Vergleich zum Spleißen verdreifachte. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sowohl bei erhöhter als auch erniedrigter Temperatur *trans*-Proteinspleißen stattfinden kann. Allerdings müssen sowohl bei 4°C als auch bei 37°C Defizite bei der Spleißausbeute in Kauf genommen werden.

In weiteren Experimenten wurden die Pufferbedingungen variiert, um das optimale Puffersystem zu finden. Zum Einen wurde die Spleißaktivität bei einem pH-Wert von 6, 7 und 8 überprüft. Im Einklang mit pH-abhängigen Spleißstudien mit anderen Inteinen (z.B. [162]) wurde eine maximale Produktausbeute bei pH 7,0 ermittelt (Abbildung 20B).

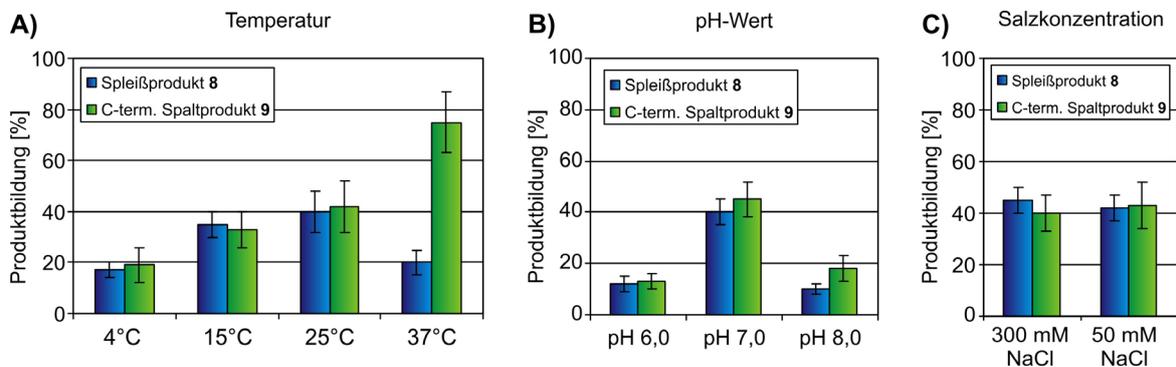


Abbildung 20. Optimierungen der Reaktionsbedingungen. Graphisch dargestellt ist die Spleißproduktbildung (blau) bzw. die Bildung des C-terminalen Spaltprodukts (grün) der Reaktion von Pep1 (58 µM) mit Protein 7 (58 µM) nach 24 h Inkubation bei verschiedenen Temperaturen (A), pH-Werten (B) und Salzkonzentrationen (C). Die Bestimmung dieser Daten erfolgte anhand eines SDS-Polyacrylamidgels durch eine densitometrische Analyse der Intensitäten der Proteinbanden. Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem mittleren Fehler aus mindestens zwei unabhängigen Messungen. Abgesehen vom jeweils angegebenen variierten Parameter wurden die Reaktionen in 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT und 10% Glycerin bei pH 7,0 durchgeführt.

Falls starke elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Inteinhälften vorhanden sind, könnte der Salzgehalt des Puffers einen entscheidenden Einfluss auf Ausbeute und

Geschwindigkeit der Spleißreaktion haben. Um dies zu untersuchen, wurde die Spleißreaktion sowohl mit hohem Salzgehalt (300 mM NaCl) als auch bei Niedrigsalz-Bedingungen (50 mM NaCl) durchgeführt. Wie in Abbildung 20C gezeigt, konnte dabei keine Veränderung der Produktbildungen beobachtet werden. Dies deutete darauf hin, dass ionische Wechselwirkungen bei der Interaktion von Int^N und Int^C keine entscheidende Rolle spielen (siehe hierzu auch Kapitel 5.2.5). Da für den Spleißmechanismus das Vorhandensein freier Thiolgruppen essentiell ist, muss die irreversible Oxidation dieser Gruppen, genauso wie die reversible Ausbildung von Disulfidbrücken, verhindert werden. Zu diesem Zweck wurde entweder das reduzierende Additiv Dithiothreitol (DTT, 2 mM) oder Triscarboxyethylphosphin (TCEP, 2 mM) dem Puffer zugegeben. Dabei konnte kein Unterschied in der Wirkung dieser beiden Reagenzien festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auch der Einfluss Protein-stabilisierender Reagenzien wie Glycerin oder Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht von 400 Da (PEG400) in variierenden Konzentrationen (10 - 50%) wurde untersucht. Hierbei konnte das Verhältnis von Spleißen zu Spaltung nicht verbessert werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings trat bei Reaktionsansätzen mit Proteinkonzentrationen größer 50 µM ein langsamer Proteinpräzipitationseffekt auf, welcher bei einer Glycerinkonzentration von 20% deutlich reduziert werden konnte. Auch ein Austausch der Puffersubstanz Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) gegen ein Phosphat- oder HEPES-basiertes Puffersystem hatte keinen signifikanten Effekt auf Spleißausbeute oder Reaktionsgeschwindigkeit (Daten nicht gezeigt).

In abschließenden Untersuchungen mit variierenden Protein- und Peptidkonzentrationen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit linear mit den eingesetzten Reaktantenkonzentrationen anstieg (siehe Kapitel 5.2.3), so dass sich hohe Peptid- und Proteinkonzentration positiv auf die Produktbildung auswirkten.

Die optimalen Reaktionsbedingungen entsprachen demnach einem Mischen von Peptid- und Proteinkomponente in möglichst konzentrierter Form mit anschließender Inkubation bei 25°C. Als optimiertes Puffersystem diente ein 50 mM Tris-Puffer mit 300 mM NaCl und einem pH-Wert von 7,0. Der Salzgehalt konnte die Spleißausbeute zwar nicht beeinflussen, aber ein hoher Salzgehalt hatte ebenfalls einen Protein-stabilisierenden Effekt. Als zusätzliche Additive waren 10 - 20% Glycerin und 2 mM DTT oder TCEP im Puffer enthalten, sowie 1 mM EDTA zur Komplexierung eventuell störender Metallkationen.

5.1.4 Mechanistische Kontrollreaktionen durch Punktmutationen spleiß-essentieller Aminosäuren

Um zu überprüfen, ob die semisynthetische Spleißreaktion gemäß der vier bekannten Reaktionsschritte des Spleißmechanismus verläuft (siehe Kapitel 2.1.1), wurden verschiedene Kontrollkonstrukte mit Punktmutationen katalytisch essentieller Aminosäuren generiert.

Im rekombinanten Kontrollkonstrukt **1a** wurde das essentielle Cys1 am N-Terminus der Int^N-Sequenz gegen ein Alanin substituiert, was zu einer Inhibierung des ersten N→S-Acyltransfers führte. Die Asparaginzyklisierung, und damit die Abspaltung des C-Exteins, blieb von einer solchen Mutation unbeeinflusst. Dies konnte durch die Reaktion von Mutante **1a** (Trx-Int^N(C1A)) mit Konstrukt **2** (Int^C-His₆) belegt werden, indem das Spleißprodukt **3** nicht mehr detektierbar war, während ein Produkt der C-terminalen Spaltung (Int^C, **5**) weiterhin beobachtet werden konnte (Abbildung 21A Spur 3). In der Kontrollreaktion mit dem nicht mutierten Protein **1** konnte die Bildung des Spleißprodukts **3** dagegen nachgewiesen werden (Abbildung 21A Spur 2). Das gleiche Ergebnis lieferte auch die entsprechende Kontrollreaktion im semisynthetischen Kontext. Bei der Umsetzung eines Cys1Ala-mutierten Peptids (Pep7, Fl-KKESG-Int^N(C1A), Übersicht aller Peptide siehe Tabelle 12 im Anhang) mit Protein **7** (Int^C-Trx-His₆) wurde das Spleißprodukt **8** nicht mehr gebildet. Die Bildung des C-terminalen Spaltprodukts **9** dagegen wurde weiterhin katalysiert (Abbildung 21B Spur 3). Im Gegensatz hierzu konnte bei der Kontrollreaktion mit dem entsprechenden unmutierten Peptid (Pep3, Fl-KKESG-Int^N(C1A)) die Bildung des fluoreszierenden Spleißprodukts **8** nachgewiesen werden (Abbildung 21B Spur 2). Die Int^N-Sequenz der hier verwendeten Peptide Pep3 und Pep7 beinhaltete lediglich die Aminosäuren 1-11, da bei späteren Studien diese als die minimal erforderliche Sequenz identifiziert wurde (siehe Kapitel 5.2.2). Auch 3 der 5 Aminosäuren des N-Exteins wurden in diesen Peptiden im Vergleich zu Pep1 anders gewählt (KKESG statt SEFSG), wodurch sich das Spleißprodukt **8** gebildet durch Pep7 (14578,0 Da) minimal vom Produkt **8** gebildet durch Pep1 (14556,0 Da) unterschied. Der Einfachheit halber wurde aber für beide Spleißprodukte die gleiche Nummerierung beibehalten.

Neben der Cys1Ala-Mutation wurden auch andere Substitutionen spleiß-essentieller Aminosäuren eingeführt und auf ihre Spleißaktivität hin untersucht. So wurde in Fusionsprotein **7a** das Ser[+1] an der C-terminalen Spleißstelle zu Alanin mutiert. Eine solche Mutation inhibiert den zweiten Schritt im Spleißmechanismus, die intramolekulare Umesterung. Der erste N→S-Acyltransfer, sowie die Asparaginzyklisierung sollten nicht gestört werden. Wie in Abbildung 21C Spur 3 gezeigt, wurde auch mit dieser Mutante **7a**

(Int^C-Trx(S[+1]A)-His₆) bei der Kontrollreaktion mit Pep1 kein Spleißprodukt **8** gebildet, sondern lediglich die C-terminale Spaltung (**9**) initiiert. Als Kontrolle diente die Umsetzung von Pep1 mit Protein **7** (Int^C-Trx-His₆), bei der neben dem C-terminalen Spaltprodukt **9** auch das fluoreszierende Spleißprodukt **8** auftrat (Abbildung 21C Spur 2).

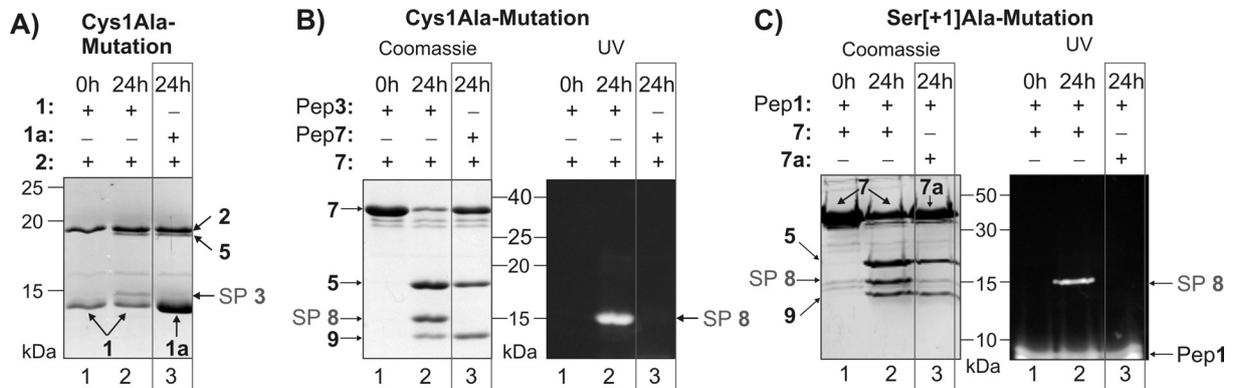


Abbildung 21. Kontrollreaktionen mit spleißinaktiven Peptid- und Proteinmutanten. **A)** Im Vergleich zu Fusionsprotein **1** (Spur 1 und 2) konnte das punktmutierte Protein **1a** (Cys1Ala) in der Reaktion mit Protein **2** kein Spleißprodukt **3**, sondern lediglich das C-terminale Spaltprodukt **5** bilden (Spur 3). **B)** In Spur 3 des Coomassie-gefärbten (links) und des unter UV-Licht photographierten (rechts) SDS-Polyacrylamidgels ist die Reaktion des mutierten Pep7 (Cys1Ala) mit Protein **7** aufgetragen. Im Vergleich zur Referenzreaktion mit Pep3 (Spur 1 und 2) wurde kein Spleißprodukt **8**, sondern nur das C-terminale Spaltprodukt **9** gebildet. **C)** Auch die Mutation Ser[+1]Ala im Protein **7a** (Spur 3) führt im Vergleich zur Kontrollreaktion mit Protein **7** (Spur 1 und 2) lediglich zur C-terminalen Spaltung (**9**). (SP = Spleißprodukt)

Weiterhin wurden zwei Kontrollproteine generiert, welche zusätzlich zur Ser[+1]Ala-Substitution eine zweite Asn154Ala- (Konstrukt **7b**) bzw. auch noch eine dritte His73Ala-Substitution enthielten (Konstrukt **7c**). Während die Mutation des Asn154 zur Inhibierung der Succinimidbildung und damit der C-terminalen Spaltung führt, ist das His73 bei der Ausbildung des Thioesters an der N-terminalen Spleißstelle entscheidend beteiligt (siehe Kapitel 2.1.1). Wie erwartet konnte mit diesen beiden Mutanten weder das Proteinspleißen noch die C-terminale Spaltung ausgelöst werden. Dafür wurde die Bildung zweier selbst unter SDS-PAGE-Bedingungen stabiler Komplexe (**I** und **II**) beobachtet (Abbildung 22B links Spur 2 und 4). Durch ein Aufkochen der Proben (10 Minuten bei 94°C) konnten diese Komplexe zerstört und stattdessen wieder die Banden der Ausgangsproteine **7b** bzw. **7c** auf einem SDS-Gel detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise war Komplex **II**, gebildet durch Referenzpeptid Pep3 und Doppelmutante **7b**, nicht fluoreszent (Abbildung 22B rechts Spur 2), während Komplex **I** der Tripelmutante **7c** deutlich und unter dem UV-Licht detektiert werden konnte (Abbildung 22B rechts Spur 4). Die Bildung des nicht-fluoreszierenden Komplexes **II** konnte durch eine Hydrolysereaktion des an der N-terminalen Spleißstelle gebildeten reaktiven Thioesters erklärt werden (Abbildung 22A). Dies wurde

durch die Identifikation des abgespaltenen N-Exteins (FI-KKESG) mittels MALDI-TOF-MS verifiziert ($[M+H]^+$ ber. = 906,3 Da; $[M+H]^+$ gem. = 906,0 Da, siehe hierzu auch Kapitel 5.3.5). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang die ungewöhnliche Reaktivität des Thioesters. Selbst bei Ausschluss aller freien Nukleophile im Reaktionspuffer (freie Thiole, Glycerin, usw.) trat die N-terminale Spaltung in unverminderter Ausbeute auf. Daraus lies sich schlussfolgern, dass die Hydrolyse durch den direkten Angriff eines Wassermoleküls ausgelöst wurde. Im Gegensatz dazu wurde mit der Tripelmutante **7c** die Bildung des Thioesters aufgrund der zusätzlich vorhandenen His73Ala-Substitution inhibiert, so dass nach der Bildung des fluoreszierenden Komplexes **I** keine N-terminale Hydrolyse auftreten konnte. Mit Mutante **7c** ließ sich somit der erste Schritt der Inteinfragment-Assoziation isoliert von allen weiteren Reaktionen betrachten, wodurch dieses Protein später auch zur Evaluierung der kinetischen Parameter der Komplexbildung herangezogen werden konnte (siehe Teil 5.2).

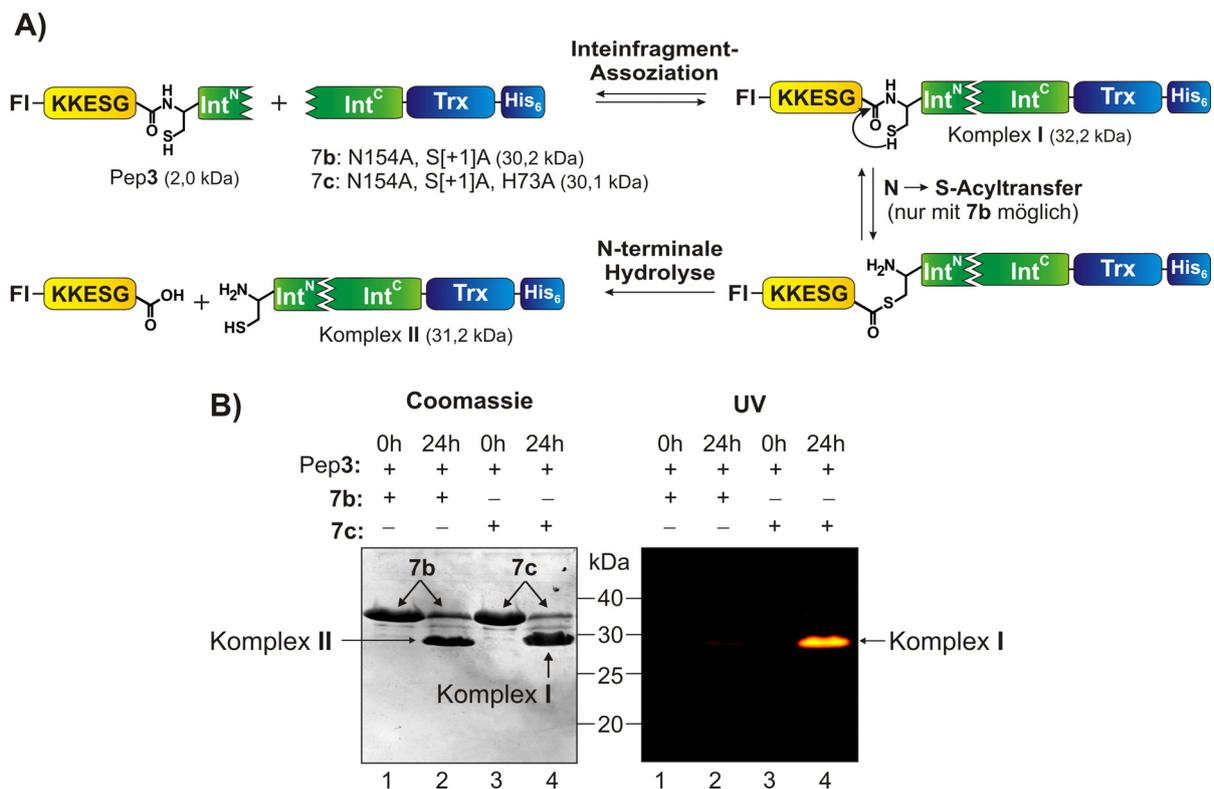


Abbildung 22. Kontrollreaktionen zur Komplexbildung. **A)** Graphische Darstellung des Reaktionswegs zur Bildung von Komplex **I** und **II**. **B)** SDS-PAGE Analyse der Reaktion von Pep3 mit Mutante **7b** bzw. **7c** durch Coomassie-Färbung (links) und mittels UV-Illumination (rechts) mit nicht aufgekochten Proben. Während es bei der Reaktion der Doppelmutante **7b** zur Bildung des nicht fluoreszierenden Komplexes **II** kam (Spur 2), konnte der durch die Tripelmutante **7c** gebildete Komplex **II** unter dem UV-Licht detektiert werden (Spur 4 rechts). Aufgrund der nicht vollständigen Denaturierung der Komplexe unter SDS-PAGE-Bedingungen korreliert die Größe der Komplexe nicht mit dem angegebenen Größenstandard.

Zusammenfassend ließen sich mit dem Proteinquartett **7**, **7a**, **7b** und **7c** alle drei katalysierten Reaktionen im Proteinspleißen schrittweise inhibieren. Gemeinsam mit der Cys1Ala-Mutation in Protein **1a** und Pep7 konnte der Verlauf der semisynthetischen Spleißreaktion gemäß des anerkannten Spleißmechanismus (siehe Kapitel 2.1.1) eindeutig belegt und veranschaulicht werden.

5.1.5 Präparative Darstellung verschiedener N-terminal modifizierter Zielproteine

Nachdem das Prinzip der Methode anhand der beschriebenen Vorversuche gezeigt werden konnte, sollte die neue Technik auch zur präparativen Darstellung semisynthetischer Proteine genutzt und die funktionelle Integrität dieser Zielproteine überprüft werden.

5.1.5.1 Semisynthetische Darstellung von Thioredoxin

Das erste semisynthetische Modellprotein, welches im präparativen Maßstab generiert und gereinigt werden sollte, war das bereits in Kapitel 5.1.2 vorgestellte N-terminal mit Carboxyfluorescein markierte Thioredoxin (**8**). Die entsprechende Reaktion von 62 μM Pep1 und 62 μM Konstrukt **7** wurde zu diesem Zweck in einem präparativen Maßstab durchgeführt (Gesamtvolumen 1,5 mL).

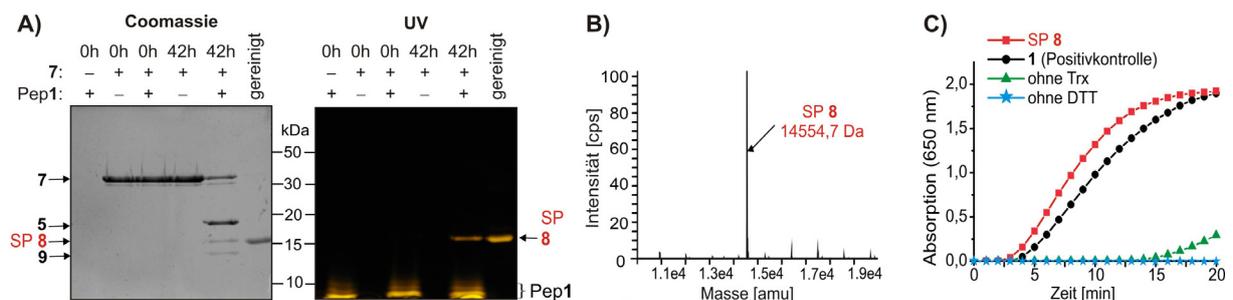


Abbildung 23. N-terminale Modifikation des Modellproteins Thioredoxin. **A)** Analyse der Spleißreaktion von Konstrukt **7** ($\text{Int}^{\text{C}}\text{-Trx-His}_6$) mit Pep1 (Fl-SEFSG- Int^{N}) mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (links) bzw. UV-Illumination (rechts). Neben dem Spleißprodukt **8** sind das C-terminale Spaltprodukt **9** und das gespleißte Int^{C} **5** markiert. **B)** ESI-TOF-MS des gereinigten Produktes **8**, $[\text{M}+\text{H}]^{\text{T}}_{\text{ber.}} = 14557,1$ Da. **C)** Enzymaktivitätstest von **8** durch Insulin-Präzipitation im Vergleich zum Trx-Kontrollkonstrukt (**1**). In zwei Negativkontrollen wurden entweder das Enzym (Trx) oder das Substrat (DTT) dem Reaktionsgemisch nicht zugefügt.

Nach 22 h Inkubation bei 25°C konnte das gewünschte semisynthetische Produkt **8** aus dem Reaktionsgemisch zunächst über eine Anionenaustausch-Chromatographie vorgereinigt und schließlich mit Hilfe der Ni^{2+} -NTA-Chromatographie in sehr guter Reinheit erhalten werden.

(siehe Abbildung 23A letzte Spur). Die Gesamtausbeute betrug hierbei ca. 30%, was einer Menge von 0,4 mg semisynthetischem Produkt **8** entsprach. Die Identität dieses gereinigten Produktes wurde durch eine ESI-TOF-Massenanalyse verifiziert (Abbildung 23B) und die enzymatische Aktivität mit Hilfe eines Insulin-Präzipitationstest untersucht (siehe Kapitel 4.4.4). Hierbei zeigte Produkt **8** eine vergleichbare Aktivität wie die rekombinant generierte Thioredoxin-Kontrolle (Konstrukt **1**, Abbildung 23C, Vergleich rote und schwarze Kurve). Dies zeigte, dass die enzymatische Funktion des Zielproteins Thioredoxin durch die Prozedur der Protein-Semisynthese nicht beeinträchtigt worden war.

5.1.5.2 Semisynthetische Darstellung der β -Lactamase

Neben dem Zielprotein Thioredoxin wurde noch ein weiteres ca. doppelt so großes Modellprotein untersucht, um die breite Anwendbarkeit der neuen Methode zu testen. Hierbei handelte es sich um die ebenfalls aus *E. coli* stammende β -Lactamase (β Lac). Durch die Hydrolyse der in allen β -Lactam-Antibiotika vorhandenen β -Lactamringstruktur verleiht β Lac seinem Wirt eine Resistenz gegen diese Antibiotika-Gruppe.

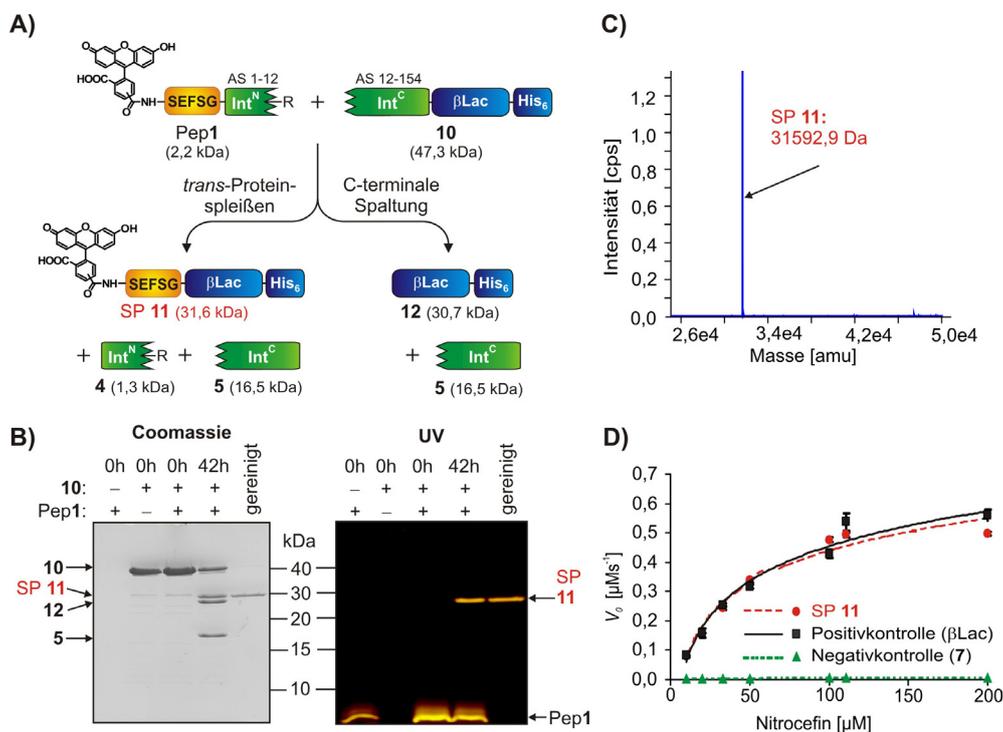


Abbildung 24. N-terminale Modifikation des Modellproteins β -Lactamase. **A)** Die Spleißreaktion von Pep1 (12 μM) und Fusionsprotein **10** (12 μM) lieferte Spleißprodukt **11**. Zusätzlich trat das C-terminale Spaltprodukt **12** auf. **B)** Analyse der Spleißreaktion und des gereinigten Spleißproduktes mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (links) bzw. UV-Illumination (rechts). **C)** ESI-TOF-MS des gereinigten Produktes **11**, $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. = 31597,7 Da. **D)** Der photometrische Enzymaktivitätstest von **11** basierend auf der Hydrolyse von Nitrocefin. Als Positivkontrolle diente das Konstrukt β -Lactamase-His₆ (β Lac), als Negativkontrolle wurde Konstrukt **7** (Int^C-Trx-His₆) genutzt. (SP = Spleißprodukt, β Lac = β -Lactamase)

Das entsprechende Fusionsprotein Int^C-βLac-His₆ (**10**) (Abbildung 24A) war, im Gegensatz zum Trx-Konstrukt **7**, nach Expression in *E. coli* unlöslich und musste durch Solubilisierung in Harnstoff-haltigem Puffer und anschließender Ni²⁺-NTA-Chromatographie aus der unlöslichen Fraktion gereinigt werden. Die Rückfaltung gelang mit Hilfe einer Dialyse gegen Harnstoff-freien Spleißpuffer. Die Spleißreaktion von Protein **10** (12 μM, 1,7 mg) mit Pep**1** (12 μM) wurde im präparativen Maßstab in einem Gesamtvolumen von 3 mL durchgeführt. dargestellt. Die Ausbeute an Spleißprodukt **11** sowie C-terminalem Spaltprodukt **12** betrug nach 42 h Inkubation bei 25°C jeweils ca. 35% (Abbildung 24B). Nach Anionenaustausch- und Ni²⁺-NTA-Chromatographie konnte auch mit diesem System das Produkt **11** in guter Reinheit (Abbildung 24B letzte Spur) und mit einer Gesamtausbeute von ca. 30% (0,3 mg) erhalten werden. Die anschließende ESI-TOF Massenanalyse bestätigte die Identität und Reinheit der Probe (Abbildung 24C). Die enzymatische Aktivität des semisynthetischen Proteins **11** wurde photometrisch durch die Hydrolyse von Nitrocefin bestimmt (siehe Abschnitt 4.4.5). Dabei konnte kein Unterschied zwischen der Aktivität des semisynthetischen Spleißprodukts **11** und einer unabhängig präparierten Positivkontrolle (βLac) beobachtet werden (Vergleich der roten und schwarzen Kurve in Abbildung 24D). Keinerlei Hydrolyse von Nitrocefin trat mit Konstrukt **7** (Int^C-Trx-His₆) auf, welches als Negativkontrolle diente (Abbildung 24D grüne Kurve). Die ermittelten kinetischen Parameter für die semisynthetische β-Lactamase **11** ($K_M(\mathbf{11}) = 119,7 \pm 4,2 \mu\text{M}$ und $k_{\text{cat}}(\mathbf{11}) = 212 \pm 30 \text{ s}^{-1}$) waren in sehr guter Übereinstimmung zu der Positivkontrolle mit der rein rekombinant generierten β-Lactamase ($K_M(\beta\text{Lac}) = 112,7 \pm 3,2 \mu\text{M}$ und $k_{\text{cat}}(\beta\text{Lac}) = 204 \pm 42 \text{ s}^{-1}$).

Die Untersuchungen mit dem Modellprotein β-Lactamase verdeutlichen, dass auch die Modifikation größerer und komplexerer Zielproteine mittels des semisynthetischen *trans*-Proteinspleißens gelingt, wenn auch die Spleißausbeuten je nach Zielprotein variieren können (ca. 45% bei Trx und ca. 35% bei βLac). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Aufreinigung des Int^C-Ex^C-Fusionsproteins aus der unlöslichen Zellfraktion durchgeführt werden konnte, d.h. eine „Rückfaltung“ des Int^C-Fragments durch Dialyse ist möglich.

5.1.6 Weitere Beispiele verschiedener Zielproteine

Bei weiterführenden Arbeiten im Arbeitskreis Mootz konnte die Anzahl der N-terminal modifizierten Proteine mittlerweile erweitert werden. Bisläng gelang zusätzlich die Markierung einer Didomänenstruktur (Adenylierungsdomäne-Peptidylcarrierprotein, A-PCP) der nichtribosomalen Peptidsynthetase GrsA aus *Bacillus brevis*, sowie des Proteins gpD aus

dem Lambda Phagen mit verschiedenen Modifikationen, wie Fluorescein oder Biotin (unpublizierte Daten von Joachim Zettler und Daniel Garbe). Am Beispiel der Synthetase GrsA wurde deutlich, dass die Einführung einer flexiblen Linkersequenz zwischen Int^C und dem Zielprotein durchaus einen positiven Effekt auf die Produktbildung haben kann.

Andererseits war die N-terminale Modifikation einiger anderer Zielproteine bislang erfolglos. So konnten beispielsweise die Fusionsproteine aus Int^C und dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) aus *A. victoria* bzw. der Proteinkinase A aus *M. musculus* zwar exprimiert und zumindest in kleinen Mengen gereinigt werden, eine Spleißproduktbildung wurde allerdings nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Auch der Versuch durch rekonstituierende Protein-Semisynthese (Definition siehe Kapitel 2.2) intakte Proteine zu erhalten ist bislang fehlgeschlagen. In einem ersten Beispiel konnte das C-terminale Fragment einer hinter Ala11 (Nummerierung siehe [163]) intern gespaltenen humanen Abl-SH3-Domäne (SH3^C) in geringen Ausbeuten (unter 5%) mit Pep1 fluoreszent markiert werden. Dabei wurde keine Mutation innerhalb der SH3^C-Sequenz eingeführt, da die N-terminalen Aminosäuren mit Ser[+1], Gly[+2] und Asp[+3] den nativen C-Extein-Aminosäuren im DnaB-Intein (Ser[+1], Ile[+2] und Glu[+3]) entsprachen oder ähnelten. Die Umsetzung mit dem entsprechenden N-terminalen Peptidfragment (NH₂-ALFVALYDFVACISGDSLISLA-COOH, die AS des SH3^N-Fragments sind unterstrichen, die des Int^N-Fragments kursiv dargestellt) führte ausschließlich zu C-terminaler Spaltung und nicht zur gewünschten Rekonstitution der nativen Abl-SH3-Domäne (Daten nicht gezeigt). Auch die Einführungen von ein bis zwei nativen Aminosäuren (Gly[-1] und Ser[-2]) innerhalb der N-Exteinsequenz des Peptids konnten dieses Ergebnis nicht verbessern. In einem zweiten Beispiel wurde das Protein HPr (Histidin-enthaltendes Protein aus *Bacillus Subtilis*) durch eine Spaltung hinter Ala19 (Nummerierung siehe [164]) in zwei Fragmente unterteilt, wobei das hierbei entstandene N-terminale Thr20 im HPr^C-Fragment zu einem Serin mutiert werden musste. Die folgenden Aminosäuren Val21 und Leu22 wurden beibehalten. Die Reinigung des Fusionsproteins Int^C-HPr^C-His₆ gelang nur unter denaturierenden Bedingungen. Nach Rückfaltung mittels Dialyse wurde durch den Umsatz mit Pep1 lediglich die quantitative C-terminale Spaltungsreaktion aber keine Spleißproduktbildung ausgelöst (Daten nicht gezeigt).

Diese Problematik der rekonstituierenden Proteinsemisynthese verdeutlicht die Sensibilität des Inteins auf äußere Faktoren, wie z.B. ungefaltete Proteinfragmente oder nicht natürliche flankierende Aminosäuren.

5.1.7 Untersuchungen zur C-terminalen Spaltung *in vivo*

Das Auftreten der C-terminalen Spaltungsreaktion war zunächst überraschend, schließlich wurde in der von Sun *et al.* durchgeführten *in-vivo*-Studie zum *Ssp* DnaB-Intein diese Nebenreaktion nicht beobachtet [67]. Auch bei der *in vitro* durchgeführten *trans*-Spleißreaktion des an der Endonuklease-Position gespaltenen *Ssp* DnaB-Inteins trat eine solche Reaktion nicht auf (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist für andere künstlich gespaltenen oder native Inteine diese Art von Nebenreaktion durchaus bekannt [11].

Zum Vergleich der *in vivo* und *in vitro* durchgeführten Reaktionen wurden die beiden Ex^N-Int^N-Fusionsproteine, mit Ex^N gleich Trx (Konstrukt **1**, Abbildung 25A) bzw. MBP (Konstrukt **14**, Abbildung 25C), mit dem Partnerprotein **7** (Int^C-Trx-His₆) in *E. coli* bei 28°C koexprimiert (siehe Kapitel 4.2.4). Die Analyse der Reaktionen erfolgte durch einen Westernblot mit einem primären Anti-His-Antikörper. Wie in Abbildung 25B und 25D gezeigt, konnte das jeweilige Spleißprodukt beider Reaktionen (**13** bzw. **15**) nach 18 h identifiziert werden. Interessanterweise konnte keine C-terminale Spaltung detektiert werden (erwartete Größe 13,7 kDa), obwohl bei den zuvor mit gereinigten Proteinen *in vitro* durchgeführten Reaktionen das typische Verhältnis von Spleißen zu Spaltung (1:1) mit einer Ausbeute von je ca. 20% beobachtet worden war (Daten nicht gezeigt). Basierend auf diesem Ergebnis wurde vermutet, dass die *in vitro* beobachtete C-terminale Spaltung durch eine unvollständige Faltung des Inteins auftrat, welche *in vivo* mit Hilfe der anwesenden Chaperone wahrscheinlich verhindert werden konnte. Gleichzeitig konnte eine Störung der Spleißreaktion aufgrund von nicht nativen Exteinsequenzen als Ursache ausgeschlossen werden.

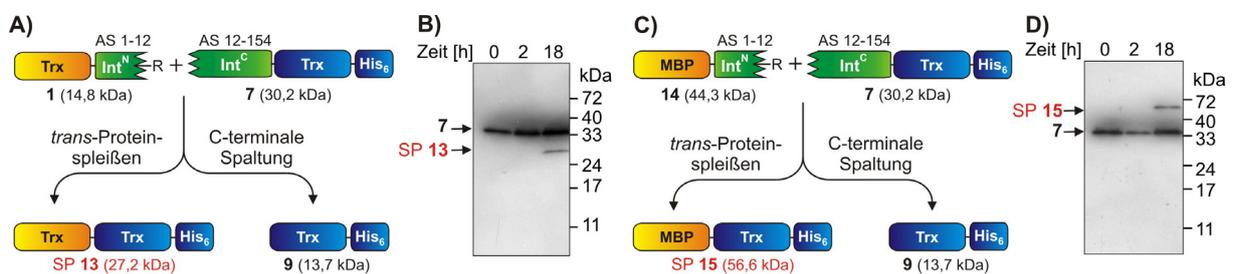


Abbildung 25. Untersuchungen zur C-terminalen Spaltung *in vivo*. **A)** und **C)** Schematische Darstellung der durchgeführten Koexpressionen in *E. coli*. Zwei verschiedene N-Exteine (Trx **1** und MBP **14**) sowie eine C-Exteinsequenz (Trx **7**) wurden verwendet. **B)** und **D)** Die Produktbildung wurde mittels eines Anti-His-Westernblots analysiert, wobei nach 18 h in beiden Fällen Spleißprodukt **13** bzw. **15** detektiert werden konnte. Das C-terminale Spaltprodukt **9** (13,7 kDa) konnte in keinem Fall beobachtet werden. (SP = Spleißprodukt, Trx = Thioredoxin, MBP = Maltose-bindendes Protein, R = Arginin)

5.1.8 Semisynthetisches *trans*-Proteinspleißen im *E. coli*-Zellextrakt

Die chemische Ligation eines Peptids mit einem Protein kann mittels Techniken wie EPL und NCL in sehr komplexen Umgebungen, wie z.B. innerhalb einer Zelle oder in einem Zellextrakt, nicht selektiv durchgeführt werden (siehe Kapitel 2.2.3.2). Bei der Inteinvermittelten Ligation tritt dieser Nachteil durch die selektive Wechselwirkung beider Inteinhälften nicht auf, so dass diese Technik bereits erfolgreich zur Protein-Semisynthese innerhalb lebender Säugetierzellen genutzt wurde [73].

Um diesen höchst interessanten Anwendungsbereich auch mit dem an Position 11 gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein zu testen, wurde die *trans*-Spleißaktivität in einem *E. coli*-Zellextrakt untersucht. Hierfür wurde Konstrukt **7** (Int^C-Trx-His₆) in *E. coli* exprimiert und die in Spleißpuffer resuspendierten Zellen anschließend mit Hilfe eines Mikrofluidizers aufgeschlossen. Die Konzentration von Protein **7** in diesem Zellextrakt betrug ca. 30 µM (Abschätzung aus SDS-Polyacrylamidgel durch Verwendung einer Eichgeraden). Die eigentliche Spleißreaktion wurde durch Zugabe eines dreifachen Überschusses an Pep**3** (90 µM) zum Zellextrakt gestartet und bei 25°C durchgeführt.

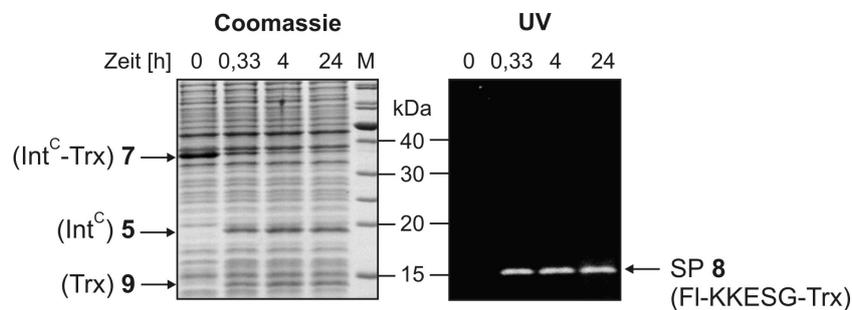


Abbildung 26. Semisynthetisches *trans*-Proteinspleißen im *E. coli*-Zellextrakt. Dargestellt ist das SDS-Polyacrylamidgel zur Analyse der Reaktion von Protein **7** (Int^C-Trx-His₆) mit Pep**3** (FI-KKESG-Int^N) zu verschiedenen Zeitpunkten. Protein **7** wurde in *E. coli* exprimiert, die Zellen anschließend aufgeschlossen und die Spleißreaktion durch die direkte Zugabe von Pep**3** zum Zellextrakt gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 25°C. Die Coomassie-Färbung (links) zeigte, dass das Ausgangsprotein **7** zum größten Teil in die Produkte **5** und **9** gespalten wurde, während Spleißprodukt **8** (FI-KKESG-Trx) lediglich mittels UV-Illumination (rechts) detektierbar war.

In Abbildung 26 ist die SDS-PAGE-Analyse der Reaktion nach 0 h, 20 min, 4 h und 24 h dargestellt. Bemerkenswerterweise konnte das Spleißprodukt **8** bereits nach 20 Minuten detektiert werden (Abbildung 26 rechts). Allerdings trat in dieser komplexen Umgebung eine stark beschleunigte C-terminale Spaltungsreaktion auf, da bereits nach den ersten 20 Minuten das Ausgangsprotein Int^C-Trx-His₆ (**7**) zum größten Teil in die beiden Produkte Int^C (**5**) und Trx-His₆ (**9**) gespalten worden war (siehe Abbildung 26 links). Daher konnte auch durch eine

längere Reaktionszeit die Ausbeute an Produkt **8** nicht signifikant gesteigert werden. Nichtsdestotrotz ließ sich mit diesem Experiment zeigen, dass eine N-terminale Modifikation von Zielproteinen in einem *E. coli* Zellextrakt realisierbar ist.

5.2 Teil 2: Optimierung und Charakterisierung des semisynthetischen *Ssp* DnaB-Inteins

5.2.1 Variation der Int^C-Sequenzlänge

Eine wichtige Voraussetzung zur Durchführung der semisynthetischen Spleißreaktion liegt in der erfolgreichen Expression des Fusionsproteins aus Int^C und dem entsprechenden Zielprotein. Wie bereits angedeutet (Kapitel 5.1.6), können je nach verwendetem Zielprotein Probleme bei der Proteinlöslichkeit oder der Proteinrückfaltung auftreten. Da dies bei der Arbeit mit Proteinfragmenten, welche wahrscheinlich in großem Maße in ungefalteter Form vorliegen, eine durchaus bekannte Problematik ist, sollte der Einfluss einer N-terminalen Verlängerung des C-terminalen Inteinfragments (Int^C) auf die Proteinstabilität sowie die Spleißaktivität untersucht werden. Mittels der in Tabelle 6 dargestellten Konstrukte sollte eine schrittweise Annäherung an die komplette Sequenz des *Ssp* DnaB-Inteins realisiert werden. Eine solche Int^C-Fragmentverlängerung könnte eventuell eine gewisse Vorfaltung des Int^C-Fragments hervorrufen, was eine verbesserte Proteinlöslichkeit zu Folge haben könnte. Allerdings birgt ein solcher Ansatz gleichzeitig das Problem einer frühzeitigen autokatalytischen Aktivität, denn je nativer die Int^C-Faltung bereits vor der Zugabe des Int^N-Gegenstücks ausgebildet ist, desto wahrscheinlicher ist das Auftreten einer verfrühten C-terminalen Spaltungsreaktion.

Als Ausgangskonstrukt diente Fusionsprotein **10** (Int^C(12-154)-βLac-His₆), welches sich nach Expression in *E. coli* in der unlöslichen Fraktion befand, aber unter denaturierenden Bedingungen und anschließender Rückfaltung gereinigt werden konnte. Eine N-terminale Verlängerung des Int^C-Fragments um 6 Aminosäuren führte zu Konstrukt **16** (Int^C(6-154)-βLac-His₆), welches bei der Proteinexpression und auch bei der Spleißreaktion mit Pep1 (Fl-SEFSG-Int^N) gleiche Ausbeuten lieferte wie Protein **10** (Tabelle 6). Eine noch weitere Verlängerung zu Int^C(3-154), wie in Konstrukt **17** realisiert, verblieb nach Expression ebenfalls in der unlöslichen Fraktion. Eine Reinigung unter denaturierenden Bedingungen und anschließende Rückfaltung führten überraschenderweise zu einem spleißinaktiven Konstrukt, welches nach Zugabe von Pep1 lediglich die C-terminale Spaltung auslöste. Konstrukt **18** stellte eine Fusion aus βLac und Int^C(2-154) dar und entsprach damit einem Cys1Gly-punktmutiertem *Ssp* DnaB-Intein. Eine solche Mutation konnte zwar die Spleißreaktion inhibieren, nicht aber die C-terminale Spaltung, welche bereits *in vivo* während der Expression in *E. coli* ohne Int^N-Zugabe ablief.

Ein weiterer Versuch die Proteinstabilität des Int^C-Fragments zu verbessern, bestand in der Einführung der im nativen *Ssp* DnaB-Maxi-Intein insertierten Endonuklease-Domäne. Hierzu wurde das Konstrukt **19** kloniert und exprimiert, welches eine Fusion aus Int^C(12-429) und Trx darstellte. Leider war dieses Konstrukt weder löslich, noch aus der unlöslichen Fraktion rückfaltbar und damit für den Zweck der Protein-Semisyntese unbrauchbar.

Tabelle 6. Int^C-Verlängerungskonstrukte zur Stabilisierung dieses Proteinfragments

Konstrukt-nummer	Kurzbeschreibung	N-terminale Sequenz*	Expression und Reinigung	Spleißprodukt mit Pep1	C-term. Spaltung mit Pep1
7	Int ^C (12-154)-Trx-His ₆	<i>MGSS</i> ...	lösliche Fraktion	ca. 45%	ca. 45%
10	Int ^C (12-154)-βLac-His ₆	<i>MGSS</i> ...	unlösliche Fraktion, rückfaltbar	ca. 35%	ca. 35%
16	Int ^C (6-154)-βLac-His ₆	<i>MGSLISLAS</i> ...	unlösliche Fraktion, rückfaltbar	ca. 35%	ca. 35%
17	Int ^C (3-154)-βLac-His ₆	<i>MSGDSLISLAS</i> ...	unlösliche Fraktion, rückfaltbar	0%	ca. 50%
18	Int ^C (2-154)-βLac-His ₆	<i>MGISGDSLISLAS</i> ...	100% C-terminale Spaltung bei Expression	–	–
19	Int ^C (12-429)-Trx-His ₆ inklusive Endonuklease	<i>MGSS</i> ...	unlösliche Fraktion, nicht rückfaltbar	–	–

*kursive Aminosäuren entsprechen dem Startmethionin und zusätzlichen Aminosäuren aufgrund von Klonierungsstrategien; fett-gedruckte Aminosäuren entsprechen der N-terminalen Verlängerung der Int^C-Sequenz im Vergleich zum Referenzkonstrukt 7; das unterstrichene Serin entspricht Ser12 im *Ssp* DnaB-Intein.

Weiterhin wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Pia Jeggle alternative nukleophile Aminosäuren am N-Terminus des C-Exteins auf ihre Spleißaktivität hin untersucht. Hierfür wurde das katalytische Ser[+1] gegen Cystein bzw. Threonin substituiert. Die zusätzliche Methylgruppe des Threonins im Vergleich zum Serin inhibierte die Bildung des Spleißprodukts vollständig, während die C-terminale Spaltung noch katalysiert wurde. Die Ser[+1]Cys-Mutation erwies sich dagegen als spleißaktiv und könnte daher als eine alternative Aminosäure an dieser Position dienen. Allerdings müssen in diesem Fall Defizite bei Spleißausbeute und eine vermehrte C-terminaler Spaltung in Kauf genommen werden (siehe Bachelorarbeit Pia Jeggle [165]).

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel mit keinem der verwendeten Int^C-Verlängerungskonstrukte eine Verbesserung der Proteinstabilität oder der Spleißaktivität erreicht werden. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Untersuchungen das Int^C(12-154)-Fragment verwendet.

5.2.2 Evaluierung der minimalen Int^N-Sequenz

Die Innovation der in dieser Arbeit etablierten neuen Methode zur Protein-Semisynthese lag in der Kürze des verwendeten N-terminalen Inteinfragments. Die kleinsten bislang in der Literatur bekannten gespaltenen Inteinfragmente bewegen sich in einer Größenordnung von 35 Aminosäuren oder mehr [73, 137-140]. Das in Pep1 verwendete Int^N-Fragment, welches lediglich die ersten 12 AS des *Ssp* DnaB-Inteins beinhaltet, stellte somit eine Verkleinerung um den Faktor 3 dar. In diesem Kapitel sollte durch eine systematische C-terminale Verkürzung des Int^N-Fragments die minimal erforderliche Sequenz identifiziert werden. Hierfür wurde die in Abbildung 27A dargestellte Peptidserie mittels Fmoc-basierter Festphasenpeptidsynthese (SPPS) synthetisiert.

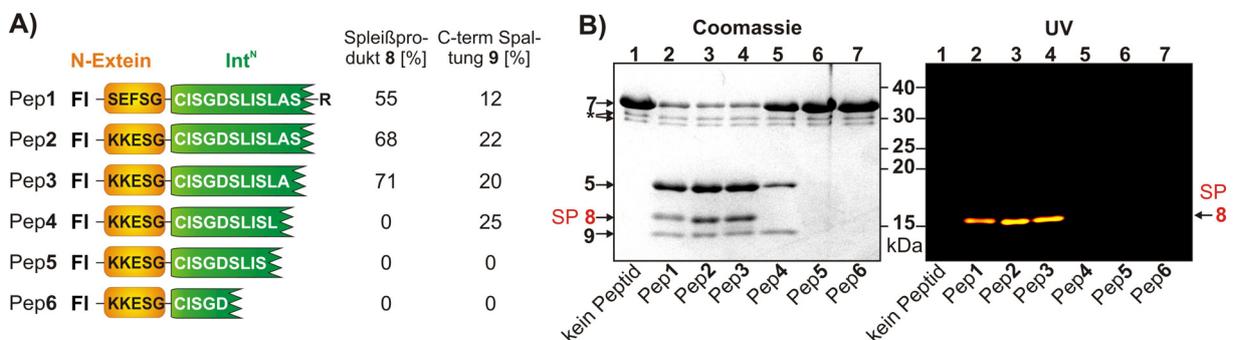


Abbildung 27. Evaluierung der minimalen Int^N-Sequenz. A) Schematische Darstellung der verwendeten Peptidserie mit schrittweise verkürzter Int^N-Sequenz. Zusätzlich sind die aus den Bandenintensitäten des Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgels ermittelten Daten der Spleißproduktbildung und C-terminalen Spaltung angegeben B) Pep1 bis Pep6 (jeweils 50 μ M) wurden mit Konstrukt 7 (50 μ M, Int^C-Trx-His₆) bei 25°C 24 h inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (links) bzw. UV-Illumination (rechts). In Spur 1 ist eine Negativkontrolle ohne Peptidzugabe aufgetragen, in Spur 2 bis 7 die Reaktionsansätze mit Pep1 bis Pep6. Das semisynthetische Spleißprodukt (SP 8), das freigesetzte Int^C (5) sowie das C-terminale Spaltprodukt (9) sind markiert. Aufgrund der unterschiedlichen N-Exteinsequenz unterschied sich das Spleißprodukt 8 der Reaktion von Pep1 und 7 (14556,0 Da) leicht von dem Produkt 8 der anderen 5 Peptide (14578,0 Da). Der Einfachheit halber wurde die gleiche Nummerierung aber beibehalten.

Das synthetisierte Pep1 entsprach exakt dem kommerziell erworbenen Peptid Pep1. Pep2 bis Pep6 enthielten neben der Int^N-Verkürzung von 13 bis auf 5 Aminosäuren auch eine leicht veränderte N-Exteinsequenz (KKESG statt SEFSG), da die Einführung zweier Lysinreste die Löslichkeit der Peptide in Wasser verbesserte und eine Reinigung mittels präparativer HPLC ermöglichte (Reinheit > 95%). Jedes dieser Peptide wurde schließlich mit Konstrukt 7 (Int^C-Trx-His₆) umgesetzt und die Produktbildung mittels SDS-PAGE untersucht (Abbildung 27B). Interessanterweise zeigte sich hierbei ein deutlich verbessertes Verhältnis von Spleißprodukt 8 (75% Ausbeute) zu C-terminaler Spaltung 9 (20% Ausbeute) im Vergleich zu den in Kapitel 5.1.2 gezeigten Ergebnissen (ca. 45% Spleißprodukt 8 und 45%

C-terminale Spaltung **9**). Da diese Verbesserung auch zwischen dem käuflich erworbenen und dem selber synthetisierten Pep**1** auftrat, konnte ein Einfluss der Lysine oder der Int^N-Verkürzung ausgeschlossen werden. Eine Racemisierung der Cysteinfunktion im kommerziellen Pep**1** könnte die beschriebenen Effekte erklären, allerdings konnte dieser Verdacht nicht experimentell nachgewiesen werden.

Die Analyse des in Abbildung 26B dargestellten SDS-Polyacrylamidgels ergab, dass Pep**3** mit der Sequenz Int^N(1-11) die minimal erforderliche Sequenz zur Spleißproduktbildung repräsentierte (Spur 4). Daher wurde dieses Peptid im Folgenden als Referenzpeptid bezeichnet und eingesetzt. Gleichzeitig implizierte dieses Ergebnis aber auch, dass eine Verlängerung der Sequenz um ein bis zwei Aminosäuren die Spleißreaktion nicht negativ beeinflusst (Verlängerung um z.B. Ser-Arg (Spur 2), Ser (Spur 3), Ser-Ala, Ser-Phe, Ser-Gly oder Gly, Daten nicht gezeigt). Eine Verkürzung der Int^N(1-11)-Sequenz auf lediglich 10 Aminosäuren (Pep**4**) verhinderte die Ausbildung jeglichen Spleißprodukts, wenn auch die C-terminale Spaltung immer noch initiiert werden konnte (Abbildung 27B Spur 5). Die Verwendung einer Int^N-Sequenz aus lediglich 9 (Pep**5**) bzw. sogar nur 5 Aminosäuren (Pep**6**) führte schließlich zu keiner detektierbaren Reaktion. Ebenfalls keine Reaktion wurde beobachtet, wenn die verkürzten Peptide Pep**5** und Pep**6** mit einem verlängerten Int^C(6-154)-Fragment (Konstrukt **16**, siehe Kapitel 5.2.1) umgesetzt wurden (Daten nicht gezeigt).

Anhand dieser Ergebnisse stellte sich nun die Frage, welcher Schritt des Proteinspleißmechanismus durch die jeweiligen Verkürzungen gestört wurde. Um dies zu untersuchen, wurden alle 6 Peptide mit der bereits in Kapitel 5.1.4 vorgestellten Tripelmutante **7c** umgesetzt, mit deren Hilfe die Assoziation der beiden Inteinfragmente isoliert von allen folgenden Reaktionsschritten untersucht werden konnte. Die Analyse der Komplexbildung erfolgte mittels nativer PAGE (Daten nicht gezeigt) und SDS-PAGE (Abbildung 28A), wobei beide Methoden das gleiche Ergebnis lieferten. Während die spleißaktiven Peptide Pep**1**, Pep**2** und Pep**3** zur Ausbildung des fluoreszierenden Komplexes **I** befähigt waren (Abbildung 28A Spur 2, 3 und 4), konnte mit den drei verkürzten Peptiden nur noch eine sehr schwache (Pep**4**) oder gar keine Komplexbildung (Pep**5** und Pep**6**) beobachtet werden. Interessanterweise konnte trotz der nur sehr schwachen Komplexbildung im Fall von Pep**4** dennoch die C-terminale Spaltung in signifikanten Mengen ausgelöst werden (vergleiche Abbildung 27B Spur 5 und Abbildung 28A Spur 5).

In einem weiteren Experiment wurde die gesamte Peptidserie mit der Doppelmutante **7b** umgesetzt, um neben der Assoziation zum Komplex **I** auch den ersten N→S-Acyltransfer auch die anschließende Hydrolysereaktion des gebildeten Thioesters, und damit die Bildung

von Komplex II, zu untersuchen (für schematische Darstellung siehe Abbildung 22A). Wie erwartet zeigten alle drei spleißaktiven Peptide Pep1, Pep2 und Pep3 die Bildung des nicht fluoreszierenden Komplexes II (Abbildung 28B, Spur 2, 3 und 4), d.h. in diesen drei Fällen wurde neben der Assoziation der Inteinfragmente auch der N→S-Acyltransfer erfolgreich katalysiert.

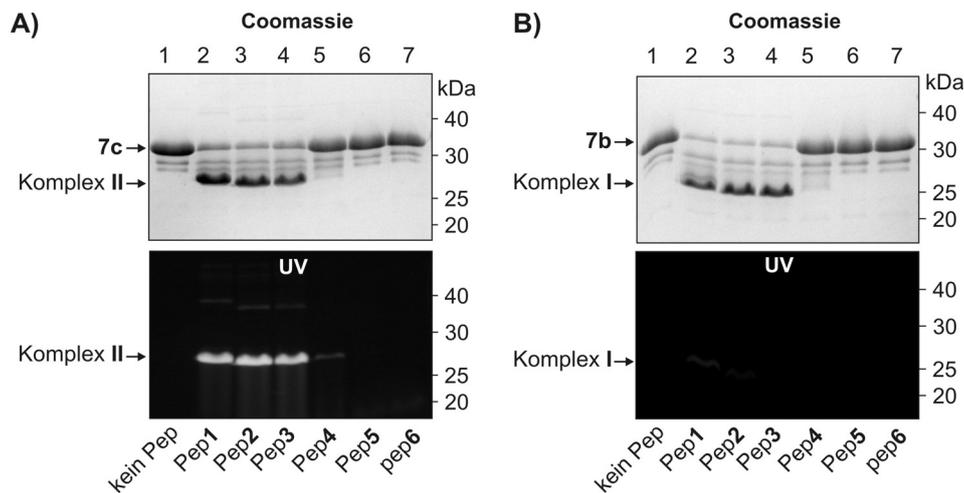


Abbildung 28. Untersuchungen zur Komplexbildung der Peptidserie mit variabler Länge der Int^N-Sequenz. SDS-PAGE-Analyse durch Coomassie-Färbung (oben) und UV-Illumination (unten) nach 24 h Inkubation bei 25°C. **A)** Die Reaktionen der Peptide Pep1 bis Pep6 (je 50 µM) mit Tripelmutante 7c (50 µM) führt lediglich bei den spleißaktiven Peptiden (Pep1, Pep2 und Pep3) zur Bildung des Komplexes II. **B)** Die unter gleichen Bedingungen durchgeführte Reaktion der Peptidserie Pep1 bis Pep6 mit der Doppelmutante 7b führt zu einem ähnlichen Ergebnis wie in A), allerdings wurde hier der nicht-fluoreszierende, da N-terminal hydrolysierte, Komplex I gebildet.

Eine nicht nur qualitative sondern auch quantitative Beschreibung der Assoziation von Peptid und Protein gelang durch Messungen der zeitlichen Veränderung der Fluoreszenz-Anisotropie. Hierfür wurden die mit 5,6-Carboxyfluorescein-markierten Peptide bei einer konstanten Konzentration von 1 µM mit variierenden Konzentrationen der Tripelmutante 7c (von 0,05 bis 30 µM) bei 30°C inkubiert. Bei einer nur schwachen Assoziation von Peptid und Protein, z.B. im Fall von Pep4, wurde die Konzentration der Tripelmutante 7c auf bis zu 75 µM erhöht. Die Assoziation der Inteinfragmente zum ca. 15-fach größeren Komplex führte zu einem Anstieg der Fluoreszenz-Anisotropie, welcher in einem Zeitrahmen von 22 h detektiert wurde (siehe Abbildung 29A). Da nach dieser Zeitspanne bei allen Reaktionen das Gleichgewicht erreicht war, konnte durch eine Auftragung der jeweils maximalen Anisotropie-Werte in Abhängigkeit von der Konzentration der Tripelmutante 7c der K_d -Wert mit Hilfe von Gl. 18 (siehe Kapitel 4.5.2.2) berechnet werden (Abbildung 28B). Im Fall des Referenzpeptides Pep3 betrug dieser $K_d = 1,1 \pm 0,2$ µM. Die graphischen Darstellungen der entsprechenden Messungen aller anderen Peptide sind im Anhang in Abbildung 52 beigelegt.

Auch die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (k_{on}) konnte mittels der gewonnenen Daten bestimmt werden. Durch ein Angleichen des Anisotropieverlaufs jener Reaktionen, welche unter den Bedingungen einer Reaktion pseudo-erster Ordnung verliefen (mindestens 5-facher Überschuss an Protein) konnten nach Gl. 7 (siehe Kapitel 4.5.1) die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung (k') ermittelt werden. Die Geschwindigkeitskonstante k_{on} ergab sich schließlich aus der linearen Regression der Auftragung von k' in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration **7c** (siehe Abbildung 29C für Pep3 und Abbildung 53 im Anhang für alle anderen Peptide). Für das Referenzpeptid Pep3 konnte auf diesem Weg eine Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung von $k_{\text{on}} = 16,8 \pm 1,0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhalten werden.

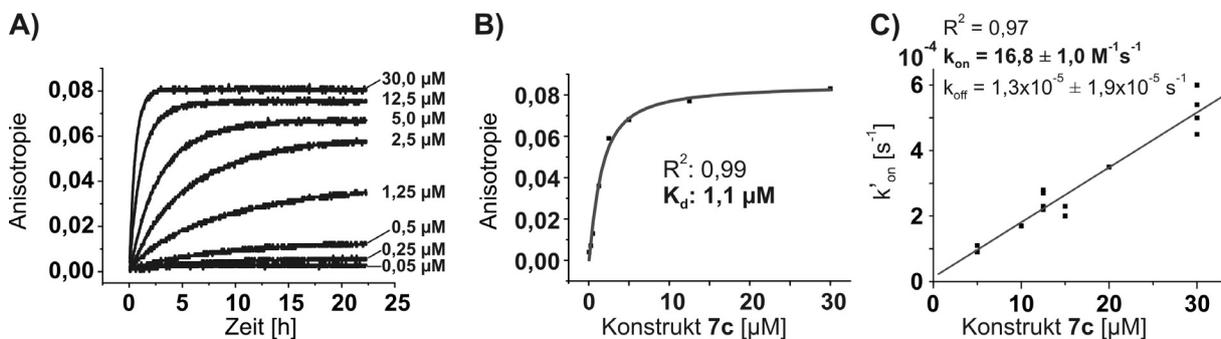


Abbildung 29. Bestimmung der kinetischen Parameter zur Komplexbildung von Pep3 mit Tripelmutante 7c durch Messungen der Fluoreszenz-Anisotropie. A) Zeitlicher Verlauf der Anisotropie bei der Assoziation von Pep3 ($1 \mu\text{M}$) mit variierenden Konzentrationen an Tripelmutante **7c** ($0,05$ bis $30 \mu\text{M}$). **B)** Auftragung der maximalen Anisotropie einer jeden Reaktion aus A) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration **7c**. Eine Angleichung dieser Werte mit Gl. 18 lieferte den K_d -wert. **C)** Mittels linearer Regression der Auftragung von k' (Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration **7c** konnte k_{on} experimentell bestimmt werden. Der k_{off} -Wert ergab sich aus dem Y-Achsenabschnitt.

Zusätzlich lieferte diese lineare Regression in Form des Y-Achsenabschnitts auch Informationen zum k_{off} -Wert. Wie für Pep3 aus Abbildung 29C ersichtlich (für andere Peptide siehe Anhang), war dieser Wert im Rahmen der Messgenauigkeit nicht signifikant von 0 verschieden ($k_{\text{off}} = 1,3 \times 10^{-5} \pm 1,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) und konnte daher mit dieser Methode nicht verlässlich bestimmt werden. Da K_d , k_{on} und k_{off} miteinander über Gl. 12 in Zusammenhang stehen ($K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$), konnte der k_{off} -Wert aus den beiden anderen Konstanten berechnet werden. Im Fall von Pep3 führte dies zu einem Wert von $k_{\text{off}} = 1,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, was einer Halbwertszeit von 11,3 h entsprach.

Eine Übersicht aller für Pep1 bis Pep6 bestimmten kinetischen Parameter ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Diese Daten bestätigten nochmals, dass die minimal erforderliche Int^N-Sequenz aus 11 Aminosäuren bestand, wie in Pep3 repräsentiert. Eine C-terminale Verlängerung dieser Sequenz, wie in Pep1 und Pep2, beeinflusste die Inteinfragment-

Assoziation nicht signifikant. Das Verkürzungspeptid Pep4 spiegelte die geringere Affinität zum Int^C-Fragment in seinem um Faktor 30 gestiegenen K_d-Wert (29,1 μM) und in dem im gleichen Maße gesunkenen k_{on}-Wert wider (0,4 M⁻¹s⁻¹). Für Pep5 und Pep6 konnte gar keine Peptid/Protein-Wechselwirkungen detektiert werden.

Tabelle 7. Kinetische Parameter der Komplexbildungsreaktion der Peptidreihe zur minimalen Int^N-Sequenz

Peptid	K _d [μM] [#]	k _{on} [M ⁻¹ s ⁻¹] ^Δ	k _{off} [10 ⁻⁵ s ⁻¹] [*]
Pep1 Int ^N (1-12)-R	0,7 ± 0,1	24,8 ± 0,7	1,7
Pep2 Int ^N (1-12)	0,9 ± 0,01	19,5 ± 0,5	1,8
Pep3 Int ^N (1-11)	1,1 ± 0,2	16,8 ± 1,0	1,8
Pep4 Int ^N (1-10)	29,1 ± 4,3	0,4 ± 0,1	1,2
Pep5 Int ^N (1-9)	n.d.	n.d.	-
Pep6 Int ^N (1-5)	n.d.	n.d.	-

* k_{off} wurde aus K_d und k_{on} berechnet; [#] Fehler entspricht der Standardabweichung aus mindestens zwei Messungen; ^Δ Fehler entspricht dem Standardfehler aus der linearen Regression von k' in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. (n.d. = nicht detektierbar, R = Arginin)

5.2.3 Kinetische Charakterisierung der Spleißreaktion

Nachdem die optimalen Sequenzlängen der beiden Fragmente Int^N und Int^C im semisynthetischen Intein ermittelt und bereits kinetische Daten zur Komplexbildung gesammelt worden waren, wurde im Folgenden die Kinetik der Spleißproduktbildung eingehend untersucht. Als Modellsystem diente hierfür das Referenzpeptid Pep3 (F1-KKESG-Int^N) sowie das Fusionsprotein 7 (Int^C-Trx-His₆). Beide Reaktionspartner wurden unter den Bedingungen einer Reaktion pseudo-erster Ordnung gemischt (mindestens 5-facher Überschuss an Pep3) und der Reaktionsverlauf über einen Zeitraum von 24 h mittels SDS-PAGE verfolgt. Beispielhaft ist die Umsetzung von 420 μM Pep3 mit 42 μM Protein 7 in Abbildung 30A dargestellt. Durch eine densitometrische Auswertung der Bandenintensität des Spleißprodukts 8 und dessen Auftragung in Abhängigkeit der Zeit, konnte die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung (k') durch ein Angleichen mit Gl. 7 bestimmt werden (Abbildung 30B). Die lineare Zunahme dieser Geschwindigkeitskonstanten mit steigender Peptidkonzentration ist in Abbildung 30C wiedergegeben. Durch lineare Regression konnte somit eine Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung mit k_{spleißen} = 0,8 ± 0,1 M⁻¹s⁻¹ bestimmt werden (Abbildung 30C). Die auf gleiche Weise bestimmte Geschwindigkeitskonstante der C-terminalen Spaltung betrug k_{C-Spaltung} = 0,1 ± 0,07 M⁻¹s⁻¹. Im Vergleich zur Komplexbildungsgeschwindigkeit des vergleichbaren Systems (Pep3 + Protein 7c mit k_{on} = 16,8 M⁻¹s⁻¹) stellt die Assoziation der beiden Inteinfragmente also nicht

den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Spleißreaktion dar. Dies ist besonders erwähnenswert, da bei allen bislang kinetisch charakterisierten gespaltenen Inteinen (*Ssp* DnaE, *Sce* VMA und *Ssp* DnaB Intein gespalten an der Endonuklease-Position) die Assoziation um ein Vielfaches schneller ablief, so dass hier lediglich Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung bestimmt wurden (siehe Diskussion Kapitel 6.2.2).

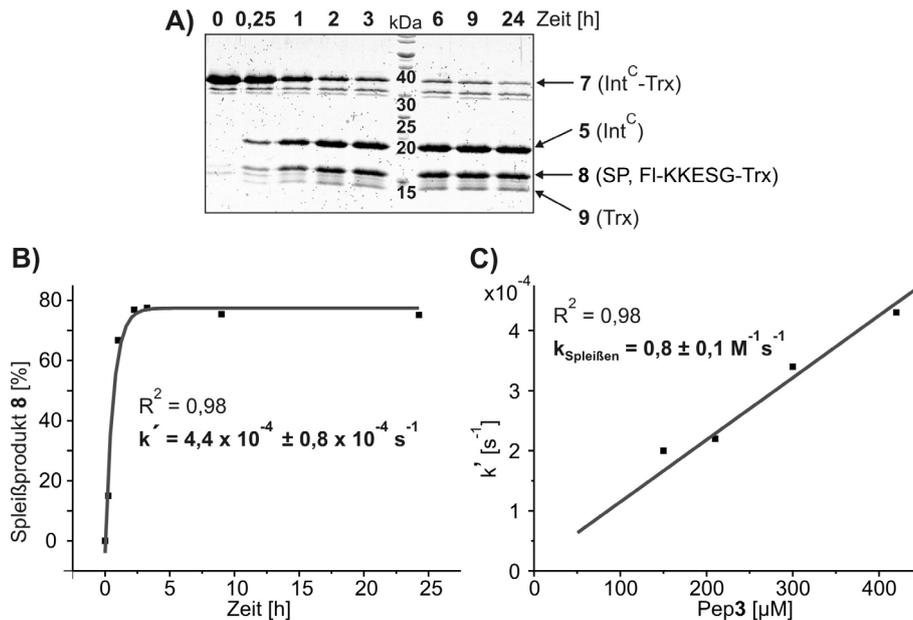


Abbildung 30. Kinetische Charakterisierung der Spleißproduktbildung. **A)** Für die Durchführung einer Spleißreaktion unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung wurde Fusionsprotein 7 (Int^C-Trx-His₆, 42 μM) mit 10 Äquivalenten an Referenzpeptid Pep3 (420 μM) umgesetzt. Die Analyse der Reaktion erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. **B)** Die relativen Bandenintensitäten von Produkt 8 aus A) wurden densitometrisch bestimmt. Durch die Auftragung der prozentualen Spleißproduktbildung in Abhängigkeit von der Zeit konnte mittels Gl. 7 die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung (k') bei der jeweiligen Peptidkonzentration berechnet werden. **C)** Die lineare Regression von k' und der Pep3-Konzentration führte schließlich zur Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung ($k_{\text{Spleißen}}$).

5.2.4 Der Alanin-Scan: Identifizierung essentieller Aminosäuren zur Int^N/Int^C-Wechselwirkung

Die erfolgreiche Assoziation und Rekonstitution des semisynthetischen *Ssp* DnaB-Inteins dieser Arbeit stellt einen in der Biochemie selten auftretenden Prozess dar. So ist es keineswegs üblich, dass zwei künstlich erzeugte Fragmente eines Proteins in Lösung spontan assoziieren und wieder in die aktive Proteinstruktur rekonstituieren. Nur einige wenige vergleichbare Beispiele einer Komplementation von Peptid- und Proteinfragmenten sind in der Literatur bereits bekannt ([75, 166-168], siehe Kapitel 6.2.1), wobei das semisynthetische *Ssp* DnaB-Intein dieser Arbeit, mit der lediglich 11 Aminosäuren umfassenden Int^N-Sequenz,

das bislang kleinste Peptidfragment darstellt. Um diese außergewöhnliche Interaktion genauer zu verstehen und zu charakterisieren, wurde ein „Alanin-Scan“ durchgeführt, d.h. jede Aminosäure der Int^N-Sequenz wurde, soweit nicht schon nativ vorhanden, gegen einen Alaninrest substituiert. Eine Übersicht dieser mittels Fmoc-basierter Festphasenpeptidsynthese generierten Peptide ist in Abbildung 31A dargestellt. Dabei wurde neben der Mutationen der ersten 10 Aminosäuren der Int^N-Sequenz (Pep7 bis Pep16) zusätzlich das Glycin an Position [-1] des N-Exteins gegen Alanin substituiert (Pep17).

In einem ersten Experiment wurde die gesamte Peptidserie (je 50 µM) mit Konstrukt 7 (50 µM, Int^C-Trx-His₆) umgesetzt, um die Spleißfähigkeit zu untersuchen. Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels SDS-PAGE nach 24 h Inkubation bei 25°C (Abbildung 31B).

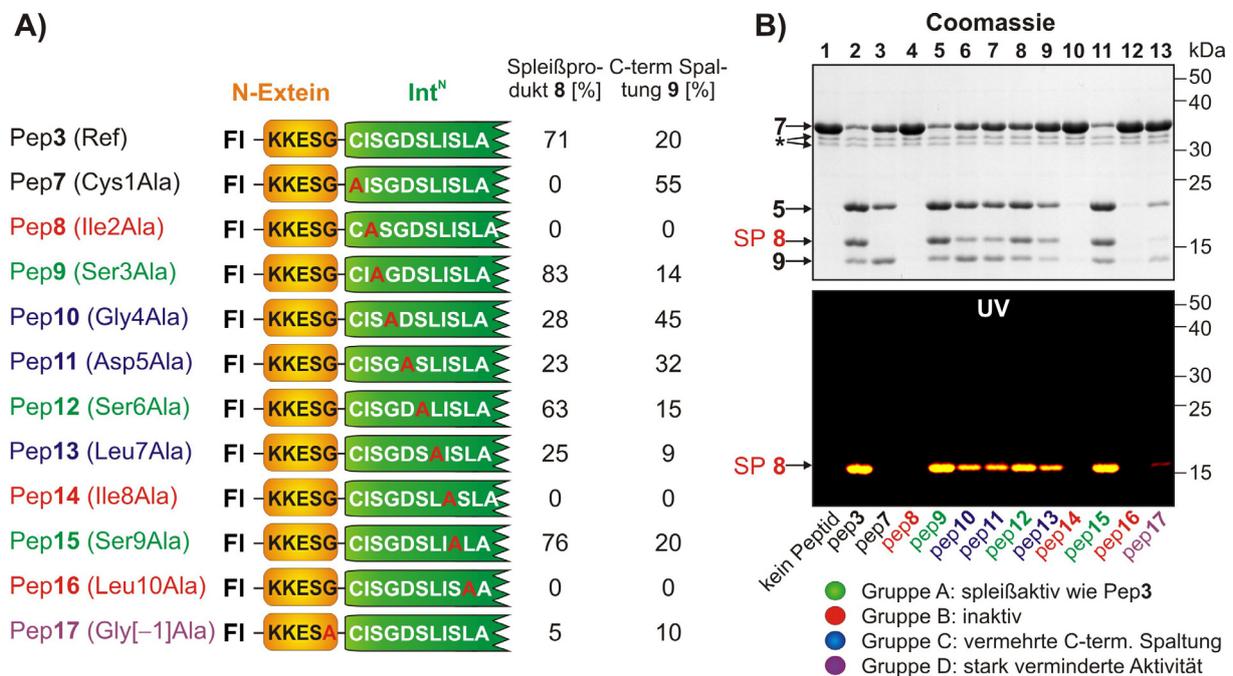


Abbildung 31. Der Alanin-Scan: Untersuchung der Spleißaktivität. **A)** Graphische Übersicht aller Peptide des Alanin-Scans. Zusätzlich sind die Bildung von Spleißprodukt **8** und C-terminaler Spaltung **9** angegeben, welche mittels einer densitometrischen Analyse des Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgels ermittelt wurden. **B)** Alle Peptide des Alanin-Scans (je 50 µM) wurden mit Konstrukt 7 (50 µM) 24 h bei 25°C inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (oben) bzw. UV-Illumination (unten) analysiert. Das freigesetzte Int^C-Fragment (**5**), sowie Spleißprodukt (SP **8**) und C-terminales Spaltprodukt (**9**) sind gekennzeichnet. Aufgrund der unterschiedlichen N-Exteinsequenz unterschied sich das Spleißprodukt **8** der Reaktion von Pep17 und 7 (14592,1Da) minimal von dem Produkt **8** der anderen 11 Peptide (14578,0 Da). Der Einfachheit halber wurde die gleiche Nummerierung aber beibehalten.

Wie erwartet und bereits in Kapitel 5.1.4 gezeigt, führte die Mutation des katalytischen Cys1 (Pep7) zum Verlust der Spleißaktivität, und lediglich zur Bildung des C-terminalen Spaltprodukts **9** (Abbildung 31B Spur 3). Die anderen Peptide konnten anhand ihres Aktivitätsprofils in vier phenotypische Gruppen unterteilt werden. Gruppe A (grün)

beinhaltete alle Peptidmutanten, welche eine zum Referenzpeptid Pep3 vergleichbare Spleißproduktbildung aufzeigten. Interessanterweise gehörten dazu ausschließlich Peptide in denen ein Serinrest zu Alanin mutiert worden war (Pep9, Pep12 und Pep15). Die zweite Gruppe B (rot) repräsentierte alle Peptide ohne eine detektierbare Aktivität. Hierbei waren immer große hydrophobe Aminosäuren von der Alanin-Mutation betroffen (Pep8, Pep14 und Pep16). Eine genaue Analyse der von Ding *et al.* 2003 publizierten *Ssp* DnaB-Intein-Kristallstruktur [47] offenbarte, dass diese drei Aminosäuren an der Ausbildung des hydrophoben Kerns beteiligt sind. Gruppe C (blau) umfasste solche Peptidmutanten, welche eine verminderte Spleißaktivität und/oder erhöhte C-terminale Spaltung aufwiesen. Die Funktionalität der beteiligten Aminosäuren in dieser Gruppe war unterschiedlich (Gly4, Asp5 und Leu7). Ein anderes Aktivitätsprofil zeigte Pep17, welches sowohl das Spleißen als auch die C-terminale Spaltung betreffend eine stark verminderte Aktivität aufwies. Dieses Peptid bildete daher alleine die Gruppe D (lila). An dieser Stelle sei bemerkt, dass der starke Einfluss der in Pep17 vorliegenden Gly[-1]Ala-Mutation einerseits überraschend war, schließlich befand sich diese Mutation nicht innerhalb der Inteinsequenz. Andererseits wurde bereits zuvor von Mathys *et al.* ein ähnlicher Phenotyp für diese Mutation im *cis*-spleißenden *Ssp* DnaB-Mini-Intein beschrieben [26].

Genauso wie in Kapitel 5.2.2 galt der nächste Analyseschritt der Aufklärung der Frage, an welcher Stelle im Proteinspleißmechanismus die eingeführten Mutationen zu Störungen im Reaktionsablauf führten. Auch diesmal wurden die beiden punktmutierten Protein **7b** (N154A, S[+1]A) und **7c** (H73A, N154A, S[+1]A) eingesetzt, um die isolierte Komplexbildung (mit **7c**) bzw. die Komplexbildung mit anschließendem N→S-Acyltransfer (mit **7b**) zu untersuchen. Die Analyse der beiden Proteine ohne Peptidzugabe mittels nativer PAGE zeigte, dass sowohl die Tripelmutante **7c** (Abbildung 32A Spur 1) als auch die Doppelmutante **7b** (Abbildung 32B Spur 13) als diskrete Banden detektiert werden konnten. Eine 24-stündige Präinkubation mit Referenzpeptid Pep3 führte zur Ausbildung der jeweiligen elektrophoretisch mobileren Komplexbande **I** bzw. **II** (Abbildung 32A Spur 2 bzw. 32B Spur 12), was eine kompaktere Tertiärstruktur der Proteinkomplexe implizierte. Für die meisten anderen Peptide konnte eine ähnliche Bandenverschiebung beobachtet werden, wobei mit der Tripelmutante **7c** die fluoreszierenden Komplexe **I** gebildet wurden, während die Komplexe **II** mit Doppelmutante **7b** nicht unter UV-Licht visualisierbar waren (Ausnahme Pep17, siehe unten). Diese Beobachtung verdeutlichte, dass beim Umsatz mit **7b** neben der Assoziation der Inteinfragmente auch der N→S-Acyltransfer erfolgreich katalysiert wurde, was zur Ausbildung und Hydrolyse des gebildeten Thioesters führte. Keine stabilen

Komplexe bildeten dagegen die inaktiven Peptidmutanten aus Gruppe B (Pep8, Pep14, Pep16). Hier wurden bei der Umsetzung mit der Doppel- (7b) und der Tripelmutante (7c) entweder gar keine oder lediglich Spuren an Komplexbildung detektiert. Damit konnte experimentell belegt werden, dass bei diesen drei Mutanten die Ursache der Spleißinaktivität in der gestörten Assoziation der Inteinfragmente lag.

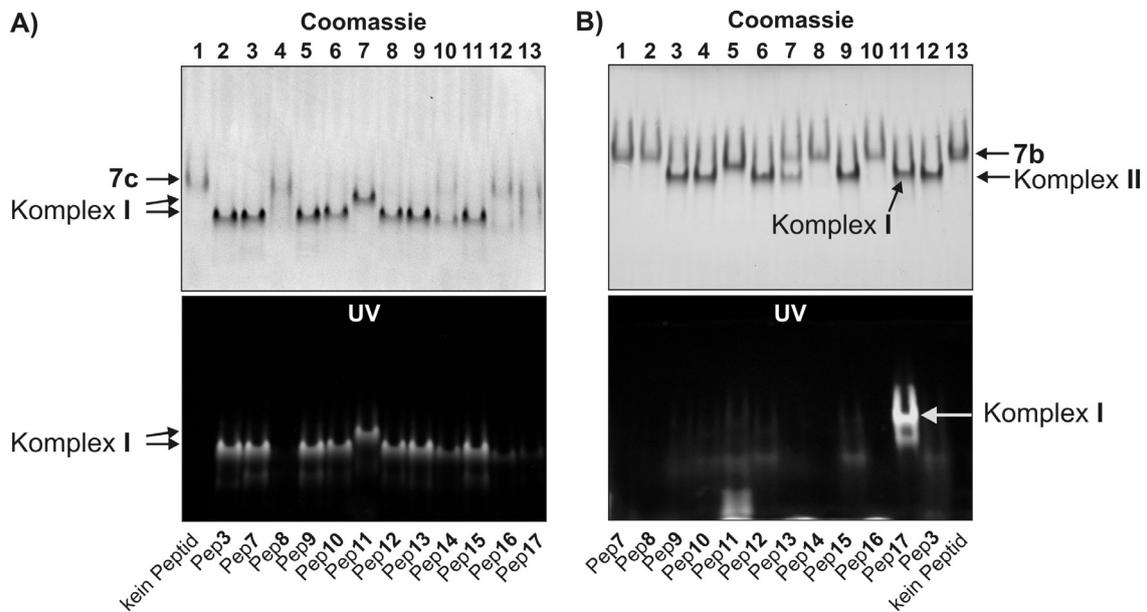


Abbildung 32. Der Alanin-Scan: Untersuchung der Komplexbildungsreaktion mittels nativer PAGE. Die Peptidreihe des Alanin-Scans wurde 24 h mit den Komplexbildungsmutanten 7c (A) bzw. 7b (B) inkubiert, wobei die Doppelmutante 7b zusätzlich zur Inteinfragment-Assoziation den anschließenden N→S-Acyltransfer katalysieren konnte. Die Peptid- und Proteinkonzentration betrug in jedem Fall 45 μM. Jeder Reaktionsansatz wurde durch native PAGE und Coomassie-Färbung (oben) bzw. UV-Illumination (unten) analysiert. Die Ausbildung der Int^N/Int^C-Komplexe führte zu Proteinbanden mit größerer elektrophoretischer Mobilität, welche entweder Komplex I (fluoreszierend) oder II (nicht fluoreszierend durch N-terminale Hydrolyse) entsprachen.

Pep11 induzierte mit beiden Proteinen lediglich einen kleinen „Banden-Shift“ (Abbildung 32A Spur 7 und 32B Spur 5). Ursache hierfür war vermutlich die Mutation der positiv geladenen Aspartat-Aminosäure zum neutralen Alanin und die damit verbundene Veränderung der elektrophoretischen Mobilität des gebildeten Komplexes. Bemerkenswert war weiterhin, dass alle Komplexe dieser Versuchsreihe auch unter SDS-PAGE-Bedingungen stabil waren, wie bereits in Kapitel 5.2.2 beschrieben (Daten nicht gezeigt).

Ein sehr überraschendes Ergebnis konnte bei der Analyse der Komplexbildungsreaktionen von Pep17 (Gly[-1]Ala) beobachtet werden. Dieses Peptid führte, im Gegensatz zu allen anderen, zur Ausbildung eines fluoreszierenden Komplexes I bei Umsetzung mit 7b (Abbildung 32B Spur 11). Daraus ließ sich schlußfolgern, dass in diesem Fall der N→S-Acyltransfer und damit die N-terminale Hydrolysereaktion inhibiert wurden, womit Pep17 einen mechanistischen Sonderfall darstellte (siehe Kapitel 5.3.1). Im

Gegensatz dazu zeigte die Reaktion von Pep17 mit Mutante 7c lediglich Spuren der Bildung von Komplex I (Abbildung 32A Spur 13), obwohl bei anschließend in Lösung durchgeführten Bestimmungen der Dissoziationskonstante eine Interaktion detektiert wurde (siehe Abbildung 33).

Die Komplexbildung eines jeden Peptids mit der Tripelmutante 7c wurde anschließend mittels zeitabhängiger Messungen der Fluoreszenz-Anisotropie analysiert. Wie aus Abbildung 33 ersichtlich, zeigten die Dissoziationskonstanten (K_d) der verschiedenen Peptidmutanten deutliche Unterschiede. Die größten Abweichungen (Faktor 12 bis 37) wurden für die inaktiven Peptide der Gruppe B detektiert (Pep8, Pep14 und Pep16), was in exzellenter Übereinstimmung mit den zuvor durchgeführten Gel-Shift-Untersuchungen war. Die K_d -Werte aller Peptide aus Gruppe A (Pep9, Pep12 und Pep15) waren mit dem Referenzpeptid Pep3 vergleichbar, genauso wie auch ihre Spleißaktivität vergleichbar gewesen war (siehe Abbildung 31).

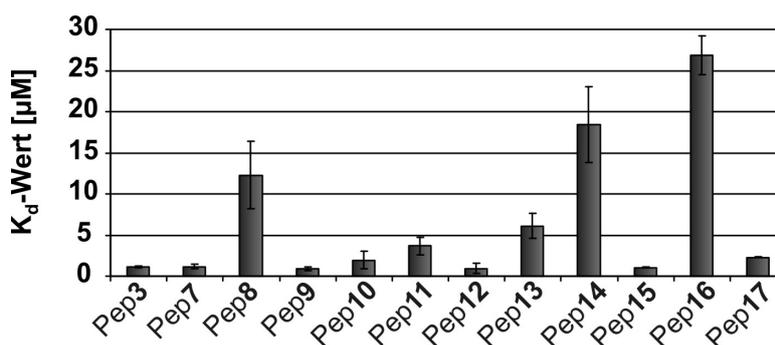


Abbildung 33. Graphische Gegenüberstellung aller Dissoziationskonstanten des Alanin-Scans. Die K_d -Werte der Komplexbildungsreaktion der Peptide Pep3 und Pep7 bis Pep17 mit Tripelmutante 7c wurden durch kinetische Messungen der Fluoreszenz-Anisotropie bestimmt.

Leicht vergrößerte Dissoziationskonstanten wurden für die Peptide der Gruppe C bestimmt (Pep10, Pep11 und Pep13). Daraus konnte geschlossen werden, dass hier die Assoziation der Inteinfragmente nur leicht beeinflusst wurde. Auch der N \rightarrow S-Acyltransfer wurde in diesem Fall erfolgreich katalysiert (Abbildung 32B), so dass eine Störung bei den folgenden Reaktionen im Spleißmechanismus, z.B. der intramolekularen Umesterung, der Grund für die schlechten Spleißausbeuten sein könnte. Eine Übersicht aller kinetischen Parameter der Komplexbildungen mit dem Alanin-Scan ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8. Kinetische Parameter der Komplexbildungsreaktionen des Alanin-Scans

Peptid	K_d [μM] [#]	k_{on} [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$] ^Δ	k_{off} [10^{-5}s^{-1}] [*]
Pep3 (Ref)	1,1 ± 0,2	16,8 ± 1,0	1,8
Pep7 (Cys1Ala)	1,2 ± 0,3	11,1 ± 1,2	1,3
Pep8 (Ile2Ala)	12,3 ± 4,1	2,5 ± 0,2	3,1
Pep9 (Ser3Ala)	0,9 ± 0,2	16,7 ± 2,2	1,5
Pep10 (Gly4Ala)	1,9 ± 1,1	9,5 ± 0,6	1,8
Pep11 (Asp5Ala)	3,7 ± 1,1	4,3 ± 0,6	1,6
Pep12 (Ser6Ala)	1,0 ± 0,6	23,3 ± 1,8	2,3
Pep13 (Leu7Ala)	6,1 ± 1,5	2,2 ± 0,3	1,3
Pep14 (Ile8Ala)	18,4 ± 4,6	0,7 ± 0,04	1,3
Pep15 (Ser9Ala)	1,1 ± 0,03	13,4 ± 0,8	1,5
Pep16 (Leu10Ala)	26,9 ± 2,4	0,6 ± 0,06	1,6
Pep17 (Gly[-1]Ala)	2,3 ± 0,1	22,0 ± 0,7	5,1

* k_{off} wurde aus K_d und k_{on} berechnet; [#] Fehler entspricht der Standardabweichung aus mindestens zwei Messungen; ^Δ Fehler entspricht dem Standardfehler aus der linearen Regression von k' in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

5.2.5 Untersuchungen zum Einfluss elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen Int^N und Int^C

Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion zwischen Int^N und Int^C sollte experimentell untersucht werden, ob neben den starken hydrophoben Wechselwirkungen (siehe Kapitel 5.2.4) auch elektrostatische Interaktionen eine Rolle spielen. Da eine solche Kraft von der Ionenstärke der Umgebung beeinflusst wird, wurden die kinetischen Parameter K_d und k_{on} der Komplexbildungsreaktion mit Tripelmutante **7c** sowohl bei Niedrigsalz- (20 mM NaCl) als auch bei Hochsalzbedingungen (300 mM NaCl) bestimmt. Diese Untersuchung wurde für das Referenzpeptid Pep3, sowie für zwei weitere Peptide mit veränderter Gesamtladung durchgeführt. Zum Einen mit Pep11, welches die Substitution Asp5Ala enthielt, und zum Zweiten mit Pep18, bei dem die negativ geladene Carboxylgruppe am C-Terminus gegen eine Amidfunktion ersetzt war. Wie in Abbildung 34 dargestellt, konnte der bei einer ionischen Wechselwirkung unter Niedrigsalz-Bedingungen erwartete Effekt einer Verkleinerung des K_d -Werts, oder einer Beschleunigung von k_{on} , in keinem Fall beobachtet werden. Im Gegenteil, die K_d -Werte zeigten eine leichte Erhöhung um ca. 25%, während k_{on} um ca. 25% langsamer wurde. Dieser Effekte könnte mit einer geringeren Proteinstabilität von **7c** bei niedrigen Salzkonzentrationen zusammenhängen.

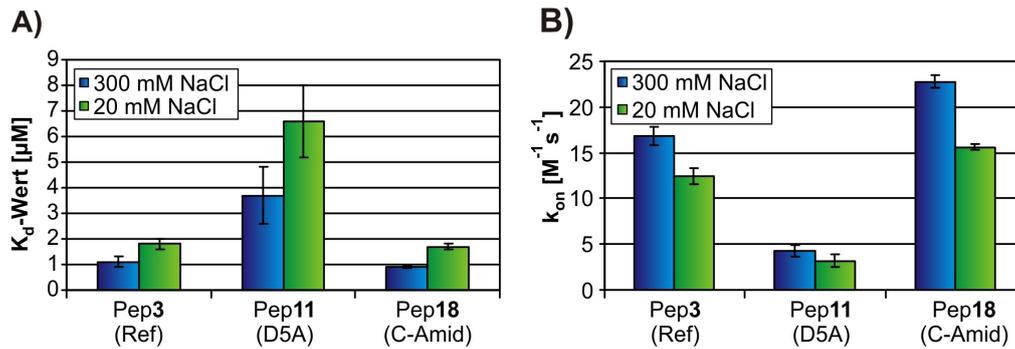


Abbildung 34. Untersuchung des Einflusses elektrostatischer Wechselwirkungen auf die Komplexbildung des semisynthetischen *Ssp* DnaB-Inteins. Die kinetischen Parameter K_d (A) und k_{on} (B) wurden unter Hoch- (300 mM NaCl, blau) sowie Niedrigsalzbedingungen (20 mM NaCl, grün) für drei Peptide mittels Messungen des kinetischen Verlaufs der Fluoreszenz-Anisotropie bestimmt. Miteinander verglichen wurden hierbei das Referenzpeptid Pep3, sowie zwei weitere Peptide mit veränderter Ladungsverteilung durch eine Asp5Ala-Mutation (Pep11) oder durch eine C-terminale Amidgruppe (Pep18).

Anhand dieser Daten konnte ein signifikanter Beitrag elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen Int^N und Int^C ausgeschlossen werden, was mit den unveränderten Spleißausbeuten unter Niedrigsalz- und Hochsalzbedingungen gut übereinstimmte (vergleiche Abbildung 20C in Kapitel 5.1.3).

5.3 Teil 3: Mechanistische Studien am semisynthetischen Intein

5.3.1 Identifikation eines Thiazolinrings als Nebenprodukt des Proteinspleißens

Die Substitution des nativen Glycins an Position [-1] des *Ssp* DnaB-Inteins zu Alanin (Pep17) führte, wie in Kapitel 5.2.4 beschrieben, zu ungewöhnlichen Ergebnissen. So konnten mit diesem Peptid bei einer Umsetzung mit dem spleißaktiven Protein **7** (Int^C-Trx-His₆) lediglich Spuren des Spleißprodukts **8** (F1-KKESG-Trx) detektiert werden (Abbildung 31B Spur 13), obwohl die Bestimmung des K_d -Werts in der Komplexbildungsreaktion mit der Tripelmutante **7c** einen zur Referenzreaktion mit Pep**3** vergleichbaren Wert zeigte (siehe Tabelle 8). Außerdem bildete Pep**17** als einzigstes Peptid in der Reaktion mit der Doppelmutante **7b** den fluoreszierenden Komplex **I**, was auf eine Inhibierung des N→S-Acyltransfers hindeutete (Abbildung 32B Spur 11). Die somit verhinderte N-terminale Hydrolysereaktion könnte durch einen Abschirmungseffekt der zusätzlichen Methylgruppe der Gly[-1]Ala-Mutation gegen ein angreifendes Nukleophil hervorgerufen worden sein. Gegen diese Theorie sprach allerdings, dass verschiedene Versuche, den potentiell gebildeten Thioester durch hohe Konzentrationen an freien Thiolen zu spalten, fehlgeschlagen sind (Daten nicht gezeigt). Weiterhin konnte durch eine MALDI-TOF-Massenanalyse der Reaktion von Pep**17** (35 μ M) mit Mutante **7b** (70 μ M) das N-terminale Hydrolyseprodukt nicht detektiert werden. Stattdessen trat ein fast quantitativer Massenverlust des Ausgangspeptids um 18 Da auf ($[M+H]^+$ ber. = 1979,9 Da; $[M+H]^+$ gem. = 1962,2). Eine HPLC-Analyse des Reaktionsansatz zum Zeitpunkt $t = 0$ h zeigte das Ausgangspeptid in Form eines Doppelsignals (siehe Abbildung 35A(I)). Dies war ein typisches Merkmal aller Fluoreszenz-markierten Peptide dieser Arbeit und sich auf die Verwendung des Regioisomerengemischs aus 5,6-Carboxyfluorescein zurückführen, da mittels MALDI-TOF-MS beiden Signalen eindeutig die gleiche Masse zugeordnet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die HPLC-Analyse des Reaktionsansatz zum Zeitpunkt $t = 24$ h offenbarte eine zwar kleine aber dennoch reproduzierbare Verschiebung der Retentionszeit des Doppelsignals 20,7 bzw. 20,9 Minuten zu 21,0 bzw. 21,2 Minuten (Abbildung 35A(II)). Mittels MALDI-TOF-MS konnte diesem neuen Doppelsignal der beobachtete Massenverlust von 18 Da eindeutig zugeordnet werden.

In weiteren Untersuchungen wurde das Verhältnis von Peptid zu Protein variiert, um zu zeigen, dass die Ausbildung der um 18 Da kleineren Peptidmasse durch die Anwesenheit der Proteinmutante **7c** initiiert wurde, und damit kein Abbauprodukt oder eine

Verunreinigung des Peptids darstellte. Während eine quantitative Umsetzung in das neue Produkt lediglich bei einem zweifachen Überschuss an Protein erreicht wurde (Abbildung 35A(II)), führte eine 1 zu 1 Umsetzung zur Ausbildung zweier überlagerter Doppelsignale (Abbildung 35A(III)). Das erste Signal bei einer Retentionszeit von 20,7 Minuten konnte hierbei eindeutig dem Ausgangspeptid Pep17 und das Signal bei 21,2 Minuten dem 18 Da leichteren Produkt zugeordnet werden. Das mittlere und intensivste Signal (21,0 Minuten) repräsentierte eine Überlagerung beider Komponenten. Eine Verdopplung der Konzentration von Pep17 im Verhältnis zur Proteinkonzentration führte zur Intensitätszunahme des Pep17-Doppelsignals (Abbildung 35A(IV)), während das Signal des Produkts Pep17-18Da unverändert blieb.

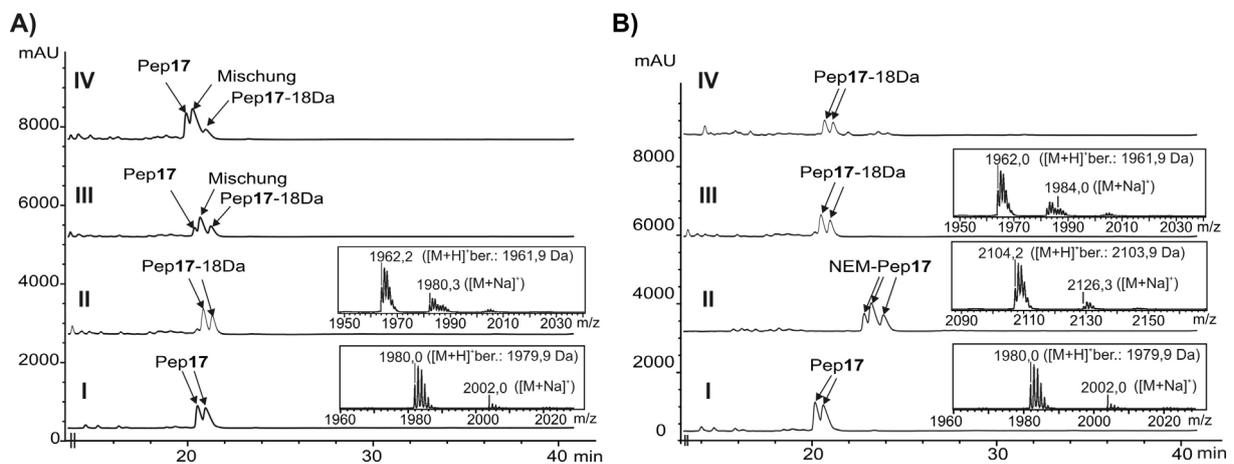


Abbildung 35. Identifizierung eines neuen Reaktionsproduktes der Komplexbildungsreaktion von Pep17 mit Protein 7b. A) Bei der Komplexbildungsreaktion von Pep17 (35 μM) mit Protein 7b (70 μM) konnte zwischen der HPLC-Analyse bei $t = 0$ h (I) und $t = 24$ h (II) eine leichte Verschiebung des Peptidsignals zu einer späteren Retentionszeit beobachtet werden. MALDI-TOF Daten bestätigten die Bildung eines neuen Produkts mit einem Massenverlust von 18 Da. Eine Erhöhung der Peptidkonzentration von 35 μM auf 70 μM (III) bzw. auf 140 μM (IV) führten zur Detektion zweier überlagerter Doppelsignale von Pep17 und Pep17-18Da. B) Mit Hilfe des Cystein-spezifischen Reagenzes N-Ethylmaleinimid (NEM) wurde die Verfügbarkeit der freien Thiolgruppe im Peptid untersucht. Eine HPLC- und MALDI-TOF-Analyse der Kontrollreaktion von Pep17 in Spleißpuffer vor (I) und nach der Modifikation mit NEM (II) zeigte eine quantitative Alkylierung der Thiolgruppe. Im Gegensatz hierzu konnte das in der Reaktion mit Protein 7b entstandene Pep17-18Da (III) durch eine Umsetzung mit NEM nicht modifiziert werden (IV).

Der Verlust von 18 Da legte die Abspaltung eines Wassermoleküls nahe, was prinzipiell an verschiedenen Aminosäurepositionen im Peptid stattfinden konnte. Da das katalytische Cys1 durch seine essentielle Rolle im Spleißmechanismus eine besonders reaktive Position darstellt, sollte die Reaktivität der Cysteinseitenkette mit Hilfe des Thiol-spezifischen Alkylierungsreagenzes N-Ethylmaleinimid (NEM) experimentell überprüft werden. Als Kontrolle diente hierbei die 24-stündige Inkubation von Pep17 (35 μM) in Spleißpuffer und die anschließende Analyse durch HPLC und MALDI-TOF-MS (Abbildung

35A(I)). Durch die Zugabe eines großen molaren Überschusses an NEM (finale Konzentration 1,4 mM) und einer weiteren Inkubation bei 25°C für 2 h, konnte eine quantitative Modifikation der Cysteinseitenkette erzielt werden (Abbildung 35B(II)). Die Ausbildung dreier Signale mit identischer Masse ließ sich auf eine Überlagerung der Signale zweier Stereoisomeren-Paare zurückführen, welche durch die Michaeladdition der zwei Regioisomeren des Peptids entstanden waren. Interessanterweise zeigte das 18 Da leichtere Produkt Pep17-18Da, welches bei der Umsetzung von Pep17 (35 µM) mit Mutante **7b** (70 µM) quantitativ entstanden war (Abbildung 35B(III)), keinerlei Anzeichen einer Modifikation mit NEM (Abbildung 35B(IV)), was darauf hindeutete, dass das katalytische Cystein am Massenverlust beteiligt sein musste.

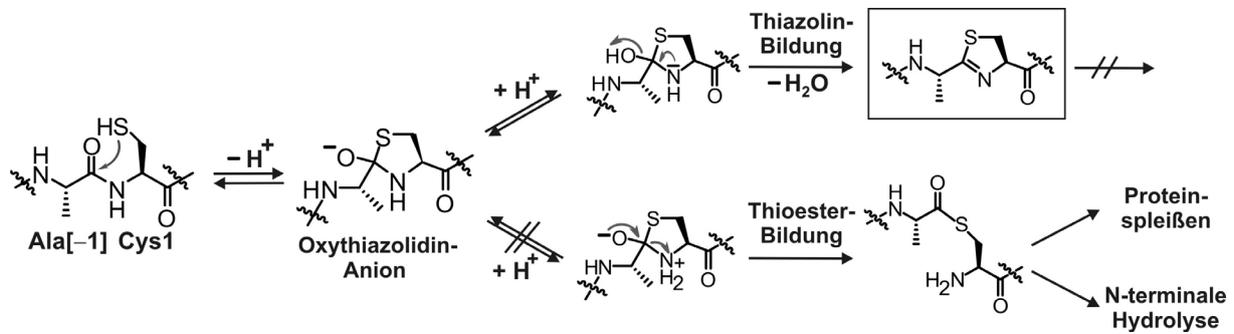


Abbildung 36. Theorie zur Thiazolinringbildung. Der $N \rightarrow S$ -Acytransfer im Spleißmechanismus des *Ssp* DnaB-Inteins verläuft über die Bildung eines postulierten Oxythiazolidin-Anion-Intermediats mit anschließender N-Protonierung und Ausbildung der Thioestergruppe. Im Fall einer Gly[-1]Ala Mutation im N-Extein könnte eine O-Protonierung mit anschließender Wasserabspaltung stattfinden, was schließlich zur Ausbildung eines Thiazolinrings führen würde.

Basierend auf den bislang vorgestellten Beobachtungen bezüglich der Reaktivität von Pep17, wurde die in Abbildung 36 veranschaulichte Theorie der Thiazolinringbildung aufgestellt. Der postulierte Weg des $N \rightarrow S$ -Acytransfer im Spleißmechanismus der Inteine erfolgt über die Ausbildung eines zyklischen Intermediats, welches die Struktur eines Oxythiazolidinrings besitzt (siehe auch Kapitel 2.1.1.1). Wahrscheinlich erfolgt die Auflösung dieses Intermediats mittels einer N-Protonierung unter Ausbildung des Thioesters [44, 47], katalysiert durch ein hoch konserviertes Histidin (im *Ssp* DnaB-Intein His73). Durch die Gly[-1]Ala-Mutation in Pep17 wird entweder eine sterische Hinderung oder eine strukturelle Veränderung der aktiven Tasche des Inteins ausgelöst, wodurch ein neuer Reaktionsweg beschrieben werden kann. Hierbei führt, ausgehend vom postulierten Oxythiazolidin-Anion, eine O-Protonierung mit anschließender Wasserabspaltung zum Thiazolinring an der N-terminalen Spleißstelle.

Zur Überprüfung dieser Theorie, wurden ESI-MS/MS sowie ESI-MS³ Messungen mit Pep17 und dem postulierten Thiazolin-Peptid (Pep17-Thiazolin) durchgeführt (Abbildung 37). Diese Messungen erforderten zunächst eine Reinigung beider Produkte mittels analytischer HPLC. Dabei konnte Pep17-Thiazolin nur im Komplex mit Protein **7b** erhalten werden (siehe Abbildung 37B(I)), was aber auf die weitere Fragmentierung des Peptids keinen störenden Einfluss hatte. Für beide Peptide ergaben die M²⁺-Ionen (Pep17 = 990,5 Da; Pep17-Thiazolin = 981,5 Da) das beste Fragmentierungsmuster im MS/MS-Experiment, so dass jeweils die Fragmentionen b₇ bis b₁₂ identifiziert werden konnten (Abbildung 37A(II) und 37B(II)). Für eine komplette Fragmentierung wurden zusätzlich MS³-Messungen basierend auf den Fragmentionen 1118,5 Da (Pep17) and 1100,5 Da (Pep17-Thiazolin) durchgeführt. Von diesen Daten für Pep17 konnten auch die Ionen b₁ bis b₆ identifiziert werden, während für Pep17-Thiazolin das Fragmention b₅ nicht detektierbar war. Dadurch konnte schließlich die genaue Position der Wasserabspaltung auf die Dipeptideinheit Ala[-1]-Cys1 lokalisiert werden.

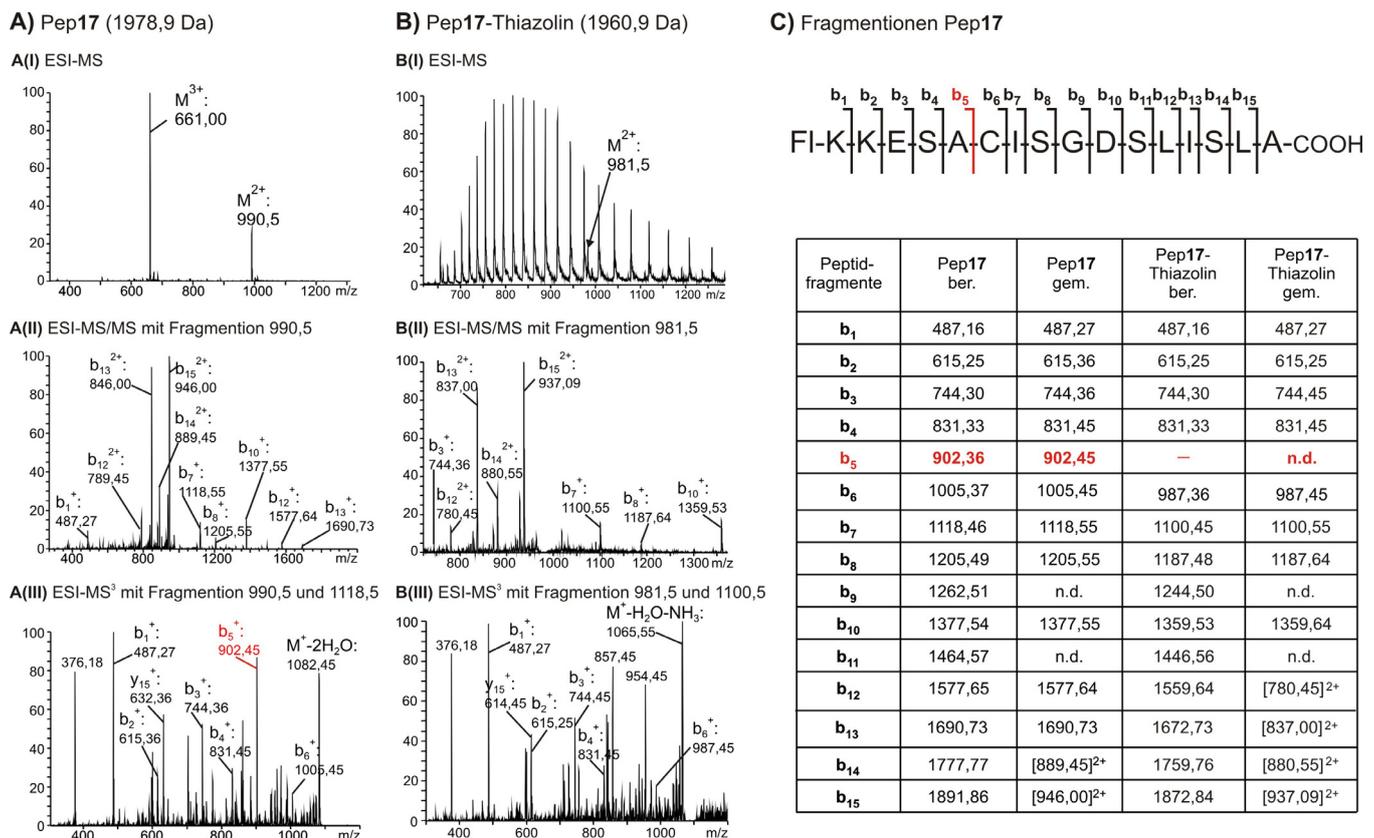


Abbildung 37. Identifikation des Thiazolins mittels ESI-MS/MS und ESI-MS³. A) und B) Dargestellt sind die ESI-MS-Spektren (I) sowie die Fragmentierungsmuster der MS/MS- (II) und MS³-Messungen (III) von Pep17 und Pep17-Thiazolin (dargestellt durch die Reaktion von Pep17 (35 μ M) mit Protein **7b** (70 μ M)). C) Übersicht aller gemessener und berechneter Fragmentionen für Pep17 und für das um 18 Da leichtere Pep17-Thiazolin. Durch die beiden positiv geladenen Lysinreste am N-Terminus des Peptids wurde fast ausschließlich die b-Typ-Serie der Fragmentionen detektiert. (n.d. = nicht detektierbar)

5.3.2 Untersuchungen zur Thiazolinbildung im Endonuklease-gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein

In einer weiteren Studie sollte untersucht werden, ob die Thiazolinbildung eine spezifische Eigenschaft des semisynthetischen Inteins ist, oder ob auch das an der Insertionsposition der Endonuklease gespalte *Ssp* DnaB-Intein (Position 104) die gleiche Reaktion eingeht. Hierfür wurden zwei N-terminale Fusionproteine generiert (**20** und **21**), die jeweils aus dem Inteinfragment Int^N(1-104) und dem N-Extein MBP aufgebaut waren, und sich lediglich in der ersten Aminosäure des N-Exteins unterschieden. Konstrukt **20** enthielt an dieser Position das native Glycin, während in Protein **21** dieses zum Alanin mutiert war (siehe Abbildung 38A). Als C-terminales spleißinaktives Gegenstück wurde das Fusionsprotein aus MBP, Int^C(105-154) und Trx mit den Punktmutationen Asn154Ala und Ser[+1]Ala verwendet (Konstrukt **22**). Die Umsetzung von Konstrukt **22** mit Protein **20** bzw. **21** wurde durch SDS-PAGE analysiert. In keinem Fall konnte eine Spleißproduktbildung oder C-terminale Spaltung detektiert werden. Stattdessen trat die Bildung zweier verschiedener Komplexe auf, wobei in der Reaktion mit Protein **21** Komplex **III** (Abbildung 38B oben Spur 4) gebildet wurde, während Konstrukt **20** die Assoziation der Inteinfragment zu Komplex **IV** katalysierte (Abbildung 38B oben Spur 9). Interessanterweise konnten diese Komplexe nur in nicht aufgekochten Proben beobachtet werden, während ein Denaturierungsschritt bei 95°C für 10 Minuten zum Verschwinden der entsprechenden Banden führte (Spur 5 und 10). Eine detaillierte Analyse der Komplexe **III** und **IV** erfolgte durch eine Identifikation der jeweiligen Proteinkomponenten. Hierfür wurden die Komplexbanden aus dem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten, in 1% SDS-haltigem Spleißpuffer mittels Ultraschall solubilisiert, bei 95°C in SDS-PAGE-Loading-Puffer denaturiert und erneut auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Die Zusammensetzung von Komplex **IV** (Abbildung 38B oben Spur 11) konnte auf die Komponenten **22** und **24** zurückgeführt werden, was eine N-terminale Hydrolyse des Ausgangsproteins **20** bestätigte. Komplex **III** war im Gegensatz hierzu aus beiden Ausgangsproteinen **21** und **22** aufgebaut (Spur 6), d.h. in diesem Fall wurde wie im semisynthetischen System die N-terminale Hydrolyse inhibiert.

Leider konnte anhand dieser Ergebnisse nicht eindeutig festgestellt werden, ob wirklich eine Thiazolinringbildung die Ursache dieser Hydrolyse-Inhibierung war. Versuche, den damit verbundenen Massenverlust von 18 Da mittels ESI-MS oder MALDI-TOF-MS nachzuweisen, schlugen fehl, da die Sensitivität und Messgenauigkeit dieser Methoden im Kontext des über 50 kDa großen Zielproteins nicht ausreichend waren. Auch ein tryptischer Verdau der Komplexbanden führte zu keinem eindeutigen Ergebnis, da das eventuell

Thiazolin-tragende Peptidfragment nicht detektiert werden konnte, weder mit noch ohne Thiazolinring.

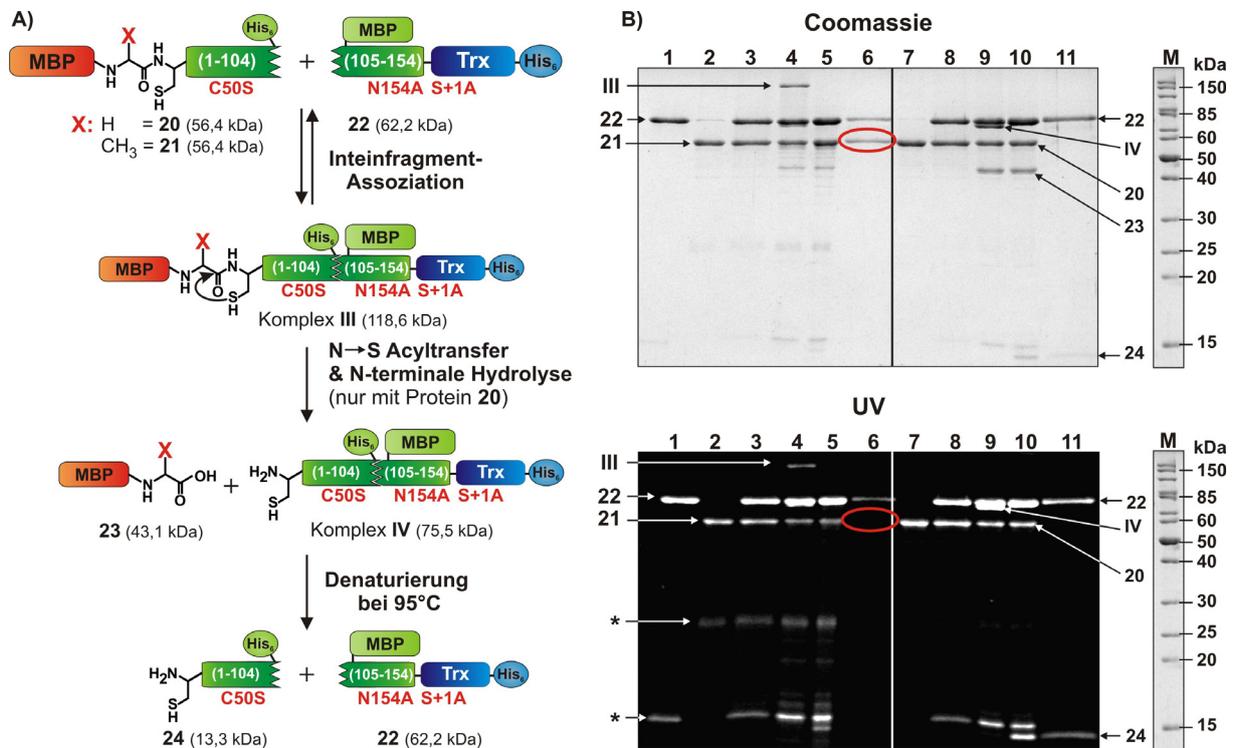


Abbildung 38. Untersuchungen zur Thiazolinringbildung mit dem Endonuklease-gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein. A) Generelles Schema der Komplexbildungsreaktion. Die MBP-Int^N(1-104)-Konstrukte mit entweder einem Glycin (20) oder Alaninrest (21) an Position [-1] wurden mit dem rekombinanten Gegenstück 22 (MBP-Int^C-Trx-His₆) umgesetzt, welches zwei zusätzliche Punktmutationen enthielt (Asn154Ala und Ser[+1]Ala). B) Untersuchung der Komplexbildung durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (oben), sowie Analyse der Cysteinmodifikation mittels UV-Illumination (unten). In Spur 1, 2 und 7 sind die drei gereinigten Ausgangsproteine 22, 21 bzw. 20 gezeigt. In Spur 3-6 ist der Reaktionsansatz von Protein 22 mit 21 aufgetragen, während in Spur 8-11 der Umsatz von 22 mit 20 dargestellt ist. Spur 3: 21 und 22 bei t = 0 h; Spur 4: 21 und 22 bei t = 24 h (nicht aufgeköcht); Spur 5: 21 und 22 bei t = 24 h (aufgeköcht); Spur 6: extrahierte und aufgeköchte Komplexbande III; Spur 8: 20 und 22 bei t = 0 h; Spur 9: 20 und 22 bei t = 24 h (nicht aufgeköcht); Spur 10: 20 und 22 bei t = 24 h (aufgeköcht); Spur 11: extrahierte und aufgeköchte Komplexbande IV; Spur M: Proteinmarker PageRuler unstained. (*Spuren von Proteinkontaminationen)

Ein indirekter Nachweis gelang allerdings über die Modifikation der freien Thiolgruppe des katalytischen Cys1 in den Konstrukten 20 bzw. 21 mit Hilfe des Cystein-spezifischen Reagenzes 5-Iodacetamidfluorescein (5-IAF). Wichtig zu erwähnen ist hierbei, dass aufgrund einer Cys50Ser-Mutation das katalytische Cys1 die einzige Cysteinfunktion innerhalb der Proteine 20 und 21 darstellte, was eine regioselektive Modifikation mit 5-IAF ermöglichte. Nach 24 h Präinkubation von Protein 20 bzw. 21 mit Konstrukt 22 (je 6 μM) wurde das Alkylierungsreagenz 5-IAF im großen Überschuss (400 μM) zugegeben. Nach weiterer Inkubation bei 25°C für 2 h wurde nicht umgesetztes Reagenz durch die Zugabe von 10 mM DTT abgefangen. Eine SDS-PAGE-Analyse führte zur Visualisierung der bereits

beschriebenen Komplexbanden unter UV-Licht (siehe Abbildung 38B unten). Die wichtigste Beobachtung hierbei war, dass von den beiden solubilisierten Komponenten von Komplex **III** lediglich das C-terminale Fusionsprotein **22** fluoreszierte, während Konstrukt **21** nicht mit 5-IAF reagiert hatte (Abbildung 38B unten Spur 6, rot umrandet). Im Gegensatz hierzu zeigten bei Komplex **IV** beide Komponenten **22** und **24** eine deutliche Fluoreszenz (Spur 11). Diese Ergebnisse veranschaulichten, dass die Thiolgruppe des Cys1 im Komplex **III** einer Alkylierungsreaktion nicht zugänglich war, was auf eine Thiazolinringbildung hindeuten könnte. Allerdings sei an dieser Stelle bemerkt, dass auch sterische Abschirmungseffekte des N-Exteins als Ursache dieser Beobachtung nicht völlig ausgeschlossen werden können.

Zusammenfassend machen die hier vorgestellten Ergebnisse die Ausbildung eines Thiazolinrings bei Anwesenheit dreier essentieller Aminosäuresubstitutionen (Gly[-1]Ala, Asn154Ala und Ser[+1]Ala) auch im Endonuklease-gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein sehr wahrscheinlich, wenn auch ein direkte Beweis bislang nicht erbracht werden konnte.

5.3.3 Evaluierung des Einflusses einer zusätzlichen Methylgruppe an Position [-1] auf Spleißen und Thiazolinbildung

Der Einfluss der Gly[-1]Ala-Mutation (Pep17) auf die Spleißproduktbildung, und schließlich die Identifikation des Thiazolinrings, waren unter mechanistischen Gesichtspunkten sehr interessant. Um den Einfluss der durch die Alaninmutation zusätzlich eingeführten Methylgruppe näher zu charakterisieren, wurden die in Abbildung 39A dargestellten Peptide Pep19, Pep20 und Pep21 synthetisiert (Pep20 und Pep21 wurden im Rahmen der Bachelor-Arbeit von Pia Jeggle hergestellt). Diese drei Peptide enthielten, genau wie das Thiazolinbildende Pep17, eine zusätzliche Methyl- bzw. Methylengruppe an der Position [-1], allerdings in Form eines unnatürlichen Aminosäurebausteins. Bei Pep19 wurde ein Alanin in *D*-Konfiguration zur Untersuchung des stereochemischen Einflusses der Methylgruppe eingesetzt. In Pep20 und Pep21 kamen die Aminosäuren β -Alanin (β Ala) bzw. Sarcosin (Sar) zum Einsatz, bei denen entweder eine zusätzliche CH₂-Gruppe das Peptidrückgrat verlängerte bzw. der Amidstickstoff methyliert vorlag (Abbildung 39A).

In einem ersten Experiment wurde der Einfluss dieser stereochemisch oder sterisch variierten Peptidmutanten auf die Bildung von Spleiß- und C-terminalem Spaltprodukt untersucht. Hierfür wurden jeweils 42 μ M Peptid mit 42 μ M Protein **7** (Int^C-Trx-His₆) bei 25°C 24 h inkubiert und die verschiedenen Reaktionsansätze anschließend mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 39B). Dabei wurde deutlich, dass im Vergleich zum zuvor

beschriebenen Pep17 (11% Spleißprodukt) jede der drei neuen Peptidmutanten eine signifikant verbesserte Spleißausbeute lieferte (32% bis 41%). Die Reaktivität des Referenzpeptids Pep3, mit 70% Spleißausbeute, konnte allerdings nicht erreicht werden. Besonders interessant war ein Vergleich von Pep17 mit Pep19, da die hier detektierte Umkehrung des Verhältnisses von Spleißen zu C-terminaler Spaltung lediglich auf die ebenfalls umgekehrte Stereochemie der Alanin-Aminosäure an Position [-1] zurückzuführen war.

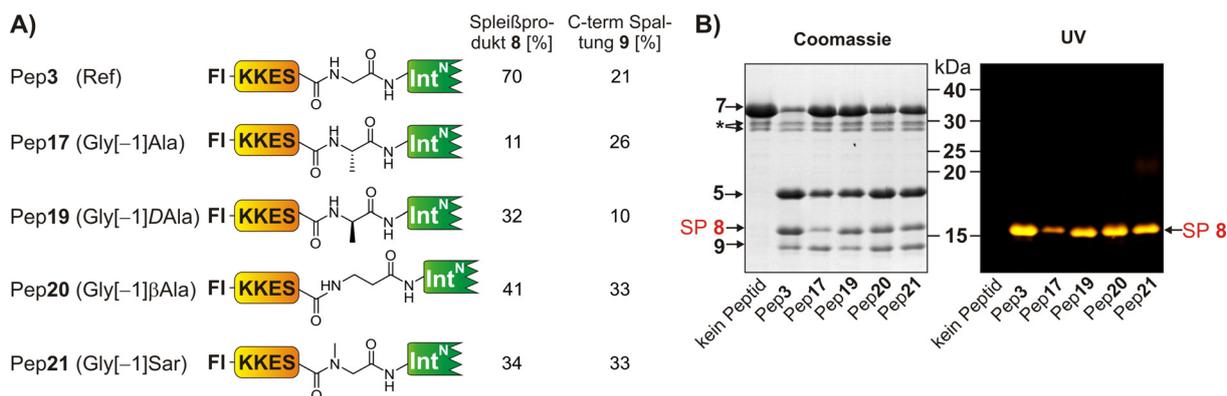


Abbildung 39. Evaluierung der Spleißaktivität von Peptidmutanten mit variiertem sterischen und stereochemischen Anspruch der Position [-1]. A) Schematische Darstellung der verwendeten Peptidserie. Folgende Abkürzungen wurden für die unnatürlichen Aminosäurebausteine verwendet: DA = Alanin in D-Konfiguration, βA = beta-Alanin, Sar = Sarcosin. Zusätzlich sind die aus den Bandenintensitäten des SDS-Polyacrylamidgels ermittelten Daten der Spleißproduktbildung und C-terminalen Spaltung angegeben. B) Die Peptide dieser Serie (jeweils 68 μM) wurden mit Konstrukt 7 (68 μM, Int^C-Trx-His₆) bei 25°C 24 h inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (links) bzw. UV-Illumination (rechts). Das semisynthetische Spleißprodukt (8), das freigesetzte Int^C (5) sowie das C-terminale Spaltprodukt (9) sind markiert. Aufgrund der unterschiedlichen N-Exteinsequenz unterschied sich das Spleißprodukt 8 der Reaktionen von Pep3 (14578,0 Da) leicht von dem Produkt 8 der anderen 4 Peptide (14592,1Da). Der Einfachheit halber wurde die gleiche Nummerierung aber beibehalten.

Neben dem Einfluss der unnatürlichen Bausteine auf die Spleißproduktbildung wurde auch eine Untersuchung der Komplex- und Thiazolinbildung durchgeführt. Hierfür wurde die in Abbildung 39A dargestellte Peptidreihe mit den Proteinmutanten 7b und 7c umgesetzt. Die Bildung der fluoreszierenden Komplexe I mit Tripelmutante 7c zeigte in keinem der drei neuen Mutanten einen signifikanten Unterschied zum Referenzpeptid Pep3 (Abbildung 40A). Die nur schwach ausgeprägte Komplexbildung von Pep17 mit Mutante 7c wurde bereits in Kapitel 5.2.4 beschrieben.

Die Bestimmung der kinetischen Parameter K_d und k_{on} durch zeitabhängige Messungen der Fluoreszenz-Anisotropie zeigte eine vergleichbare Assoziation der Inteinfragmente aller Peptide dieser Serie (siehe Tabelle 9). Auch die Komplexbildung mit der N→S-Acyltransfer-katalysierenden Doppelmutante 7b gelang mit jedem Peptid dieser

Reihe (Abbildung 40B oben). Die Analyse des SDS-Polyacrylamidgels unter UV-Licht offenbarte, dass die Komplexe der drei in diesem Kapitel eingeführten Peptid-Varianten (Pep19, Pep20 und Pep21) nur Spuren von Fluoreszenz aufwiesen und sich damit wie der Komplex des Referenzpeptids Pep3 verhielten. Damit konnte eine Thioesterbildung an der N-terminalen Spleißstelle und eine anschließende N-terminale Hydrolysereaktion nachgewiesen werden, während die Thiazolinringbildung auf die Reaktion von Pep17 mit Protein 7b beschränkt war (Abbildung 40B unten).

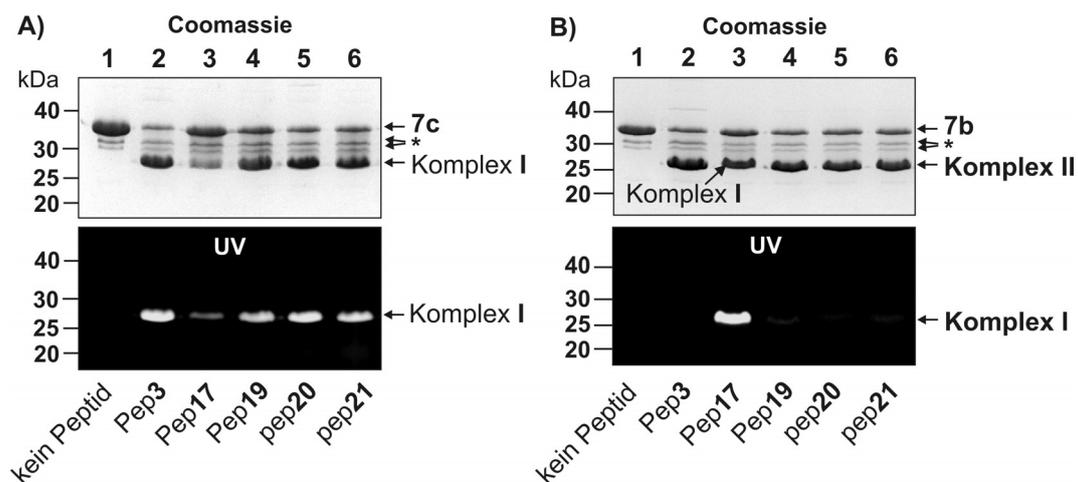


Abbildung 40. Untersuchung der Komplexbildungseigenschaften der Peptide mit variiertem sterischen und stereochemischen Anspruch an Position [-1]. A) Eine 24 h Umsetzung der Peptide mit verschiedenen unnatürlichen Aminosäurebausteinen an Position [-1] (Pep19 = DAla, Pep20 = β Ala und Pep21 = Sar, je 60 μ M) mit der Tripelmutante 7c (60 μ M) führte zur Ausbildung der fluoreszierenden Komplexe I, wie mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (oben) bzw. UV-Illumination (unten) gezeigt. Als Vergleich dienten die Reaktionsansätze mit Referenzpeptid Pep3 (Spur 2) und dem sterisch vergleichbar anspruchsvollen Pep17 (Spur 3). B) Die Umsetzung der gleichen Peptide unter den selben Bedingungen mit Doppelmutante 7b, welche auch den ersten N \rightarrow S-Acylyltransfer erfolgreich katalysiert, führte mit Ausnahme von Pep17 (Spur 3) zur Ausbildung der N-terminal hydrolysierten Komplexe II.

Die Bildung der N-terminalen Hydrolyseprodukte (Fl-KKESX und Int^N) für Pep19, Pep20 und Pep21 wurde mittels MALDI-TOF-MS erfolgreich verifiziert (Daten nicht gezeigt). Eine ungewöhnliche Ausnahme bildete hierbei Pep21 (Gly[-1]Sar). Die MALDI-TOF-Analyse der Reaktion dieses Peptids mit Doppelmutante 7b sowie mit Protein 7 (Int^C-Trx-His₆) offenbarte ein N-terminales Hydrolyseprodukt mit einem Massenverlust von erneut 18 Da. Dies wiederum deutete auf eine weitere Zyklisierungsreaktion und damit auf ein weiteres mögliches Nebenprodukt im Proteinspleißmechanismus hin (für Details siehe Kapitel 5.3.4).

Tabelle 9. Kinetische Parameter der Komplexbildung der Peptidreihe mit variiertem sterischen und stereochemischen Anspruch an Position [-1]

Peptid	K_d [μM] [#]	k_{on} [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$] ^Δ	k_{off} [10^{-5}s^{-1}] [*]
Pep3 (Ref)	1,1 ± 0,2	16,8 ± 1,0	1,8
Pep17 (Gly[-1]Ala)	2,3 ± 0,1	22,0 ± 0,7	5,1
Pep19 (Gly[-1]DAla)	3,3 ± 0,1	10,3 ± 0,4	3,4
Pep20 (Gly[-1]βAla)	1,0 ± 0,05	22,8 ± 0,9	2,3
Pep21 (Gly[-1]Sar)	2,1 ± 0,2	15,5 ± 0,7	3,3

* k_{off} wurde aus K_d und k_{on} berechnet; [#] Fehler entspricht der Standardabweichung aus mindestens zwei Messungen; ^Δ Fehler entspricht dem Standardfehler aus der linearen Regression von k' in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse zur Komplexbildung lieferten Hinweise darauf, dass die Aminosäure der Position [-1] bei der Assoziation beider Inteinfragmente keine entscheidende Rolle spielt. Allerdings zeigten die Reaktionen der Peptide mit sterisch anspruchsvollen Aminosäuresubstitutionen an Position [-1] mit dem spleißaktiven Protein **7** in jedem Fall eine verschlechterte Spleißausbeute. Den deutlich größten Einfluss hatte die Gly[-1]Ala-Mutation in Pep17, welche außerdem beim Umsatz mit der Doppelmutante **7b** die Bildung eines Thiazolinrings katalysieren konnte. Weder mit einem Alanin in der *D*-Konfiguration noch mit β-Alanin oder Sarcosin konnte ein entsprechendes Produkt beobachtet werden.

5.3.4 Identifikation eines Lactonrings als Nebenprodukt im Proteinspleißen

Wie im vorherigen Kapitel 5.3.3 bereits erwähnt, konnte sowohl bei der Reaktion von Pep21 (Gly[-1]Sar) mit Protein **7** (Int^C-Trx) als auch mit der spleißinaktiven Doppelmutante **7b** (Asn154Ala, Ser[+1]Ala) das N-terminale Hydrolyseprodukt (Fl-KKESsar) mit einem Massenverlust von 18 Da detektiert werden ($[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. = 920,4; $[\text{M}+\text{H}]^+$ gem. = 902,3, siehe Abbildung 41B(I)). Da die Abspaltung eines Wassermoleküls in Verbindung mit einer Zyklisierungsreaktion am reaktiven Cys1 bereits in einem anderen Beispiel experimentell belegt werden konnte (Kapitel 5.3.1), wurde auch in diesem Fall das Auftreten einer Zyklisierung in Betracht gezogen. Der Massenverlust beim N-terminalen Hydrolyseprodukt trat lediglich mit der N-methylierten Peptidmutante Pep21 (Gly[-1]Sar) auf, so dass der Einfluss einer veränderten *cis/trans*-Konfiguration dieses Peptides besonders betrachtet wurde. Während die meisten natürlichen Aminosäuren ausschließlich *trans*-ständige Peptidbindungen ausbilden, können N-alkylierte Aminosäuren, wie z.B. Prolin oder Sarcosin,

sowohl in der *cis*- als auch der *trans*-Konfiguration vorliegen. Basierend darauf wurde die in Abbildung 41A dargestellte Theorie entwickelt. Danach könnte durch eine Umformung von Pep21 in die *trans*-Konfiguration ein nukleophiler Angriff der Seitenkette des Ser[−2] auf den gebildeten Thioester möglich sein. Auf diese Weise würde die Peptidbindung zwischen Ex^N und Int^N gespalten und gleichzeitig das Lactonprodukt **25** gebildet werden.

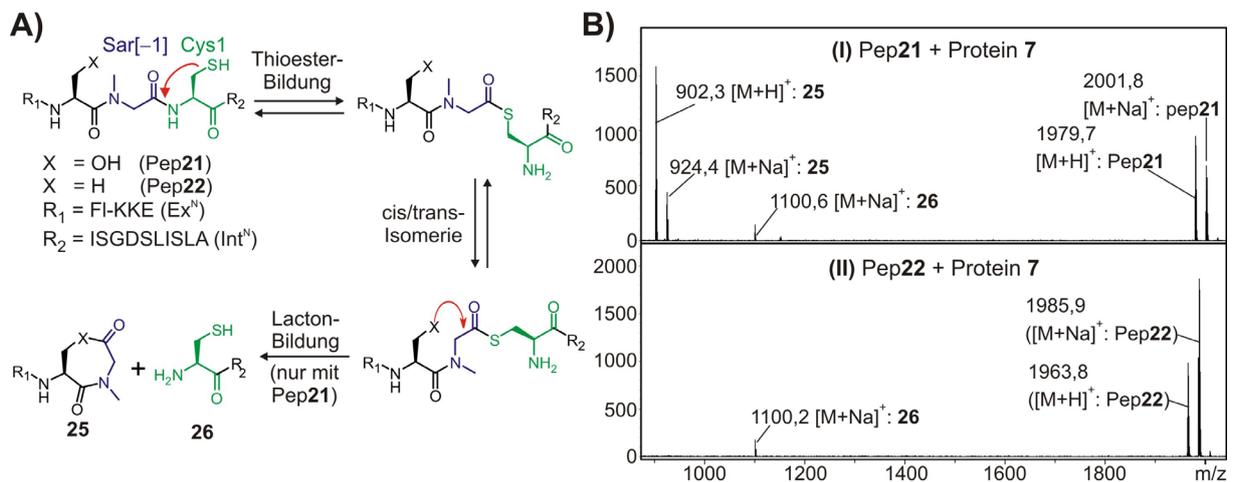


Abbildung 41. Analyse der Lactonzyklisierung mittels MALDI-TOF-MS. A) Graphische Darstellung der Lactonzyklisierung im Fall einer N-methylierten Aminosäure (Sarcosin) an Position [−1] B) Pep21 (I) und Pep22 (II) wurden mit Protein 7 (Int^C-Trx-His₆) bei 25°C 24 h inkubiert (je 42 μM). Mittels MALDI-TOF-MS wurden beide Reaktionsansätze analysiert. Für Pep21 konnten das Lactonprodukt **25** ([M+H]⁺ber. = 902,3 Da), das Int^N-Fragment **26** ([M+Na]⁺ber. = 1100,5 Da) sowie das Ausgangspeptid Pep21 ([M+H]⁺ber. = 1979,9 Da) detektiert werden. Mit Pep22 wurde dagegen keine Zyklisierung, sondern lediglich das Int^N-Fragment (als Produkt der katalysierten Spleißreaktion) und das Ausgangspeptid ([M+H]⁺ber. = 1963,9 Da) nachgewiesen.

Zur experimentellen Überprüfung dieser Theorie wurde das Peptid Pep22 synthetisiert (Abbildung 41A). Diese Mutante enthielt genau wie Pep21 das N-methylierte Sarcosin an Position [−1], allerdings war das zweite zur Lactonringbildung notwendige Nucleophil (Ser[−2]) zu einem Alanin substituiert worden. Eine Umsetzung dieses Peptids mit Protein 7 und die anschließende Analyse des Reaktionsgemisches durch MALDI-TOF-MS lieferten lediglich das freigesetzte Int^N-Fragment (**26**) und das Ausgangspeptid (Pep22), jedoch kein zyklisiertes Produkt (**25**) (Abbildung 41B(II)). Dies deutete darauf hin, dass in diesem Fall die Zyklisierung vollständig inhibiert war, was eine Bestätigung der Theorie aus Abbildung 41A darstellte. Weiterhin konnte keine Verbesserung der Spleißaktivität von Pep22 im Vergleich zu Pep21 erzielt werden (beides Mal ca. 35% Spleißprodukt- und 35% C-terminale Spaltproduktbildung, Daten nicht gezeigt), obwohl die N-terminale Hydrolysereaktion lediglich als Nebenreaktion mit Pep21 auftrat.

5.3.5 Mechanistische Untersuchungen in ^{18}O -isotopenmarkiertem Wasser

Die Spleißreaktion ist ein komplexes und hoch koordiniertes Zusammenspiel mehrerer nukleophiler Angriffe und Acyltransfers. Wie in den vorherigen Untersuchungen gezeigt, konnten durch gezielte Mutationen katalytisch essentieller Aminosäuren oder durch strukturelle Veränderungen im Aufbau der aktiven Tasche, alternative Reaktionswege induziert und Nebenprodukte erhalten werden. Diese beinhalteten die im Zusammenhang mit Intein bereits seit langem bekannte Abspaltung des C-Exteins durch eine frühzeitige Asparaginzyklisierung oder des N-Exteins durch eine Hydrolyse des zwischenzeitlich gebildeten Thioesters (siehe Kapitel 5.1.4). Weitere Nebenprodukte, welche im Rahmen dieser Arbeit erstmalig durch die Verwendung punktmutierter Peptid- und Proteinkonstrukte identifiziert werden konnten, waren die Ausbildung eines Thiazolinrings (Kapitel 5.3.1) und eines zyklischen Lactonprodukts (Kapitel 5.3.4). Da fast alle diese Nebenreaktionen die Abspaltung oder der Aufnahme eines Wassermoleküls beinhalten, sollte mittels einer in ^{18}O -isotopenmarkiertem Puffer durchgeführten Studie der Austausch eines Wassermoleküls experimentell bestätigt werden. Besonders interessant war diese Untersuchung im Hinblick auf die Thiazolinbildung, welche als generelles Intermediat der Spleißreaktion diskutiert wurde, indem ein kurzlebiger Thiazolinring durch den Angriff eines Wassermoleküls erneut geöffnet und zum Thioester weiter prozessiert werden könnte. Eine solche Hypothese, die die Aufnahme von ^{18}O -markiertem Wasser in das Spleißprodukt bedingen würde, konnte mit dieser Untersuchung überprüft werden.

Pep1 (40 μM) wurde mit Protein 7 (11 μM) in einem Spleißpuffer mit ^{18}O -isotopenmarkiertem Wasser umgesetzt. Die Analyse des Spleißprodukts **8** erfolgte nach 24 h Inkubation bei 25°C und SDS-PAGE mittels eines tryptischen Verdau, der aus dem Polyacrylamidgel herausgeschnittenen Produktbande. Auf diese Weise wurde das Ligationsfragment von Interesse (F1-SEFSGSIEGSGGGSDK, $[\text{M}+\text{H}]^+\text{ber.} = 1858,6 \text{ Da}$) eindeutig detektiert. Allerdings konnte zwischen einer in ^{16}O - (Abbildung 42B blau) bzw. ^{18}O -markiertem Wasser (rot) durchgeführten Reaktion keinerlei Unterschied festgestellt werden, was die Hypothese eines Thiazolin-Zwischenprodukts entkräftete. Ein tryptischer Verdau des C-terminalen Spaltprodukts (**9**) der gleichen Reaktion zeigte ebenfalls keine Anzeichen eines Austauschs von ^{16}O gegen ^{18}O (Daten nicht gezeigt). An dieser Stelle sei der Vollständigkeit halber erwähnt, dass ein tryptischer Verdau des Reaktionsansatzes mit Referenzpeptid Pep3 ebenfalls durchgeführt wurde. Allerdings konnte in diesem Fall das entscheidende Peptidfragment der Ligationsstelle im Spleißprodukt **8** (ESGSIEGSGGGSDK, $[\text{M}+\text{H}]^+\text{ber.} = 1266,2 \text{ Da}$) mittels MALDI-TOF-MS nicht nachgewiesen werden, wodurch

dieses System zur Untersuchung einer zwischenzeitlichen Thiazolinstruktur nicht verwendet werden konnte.

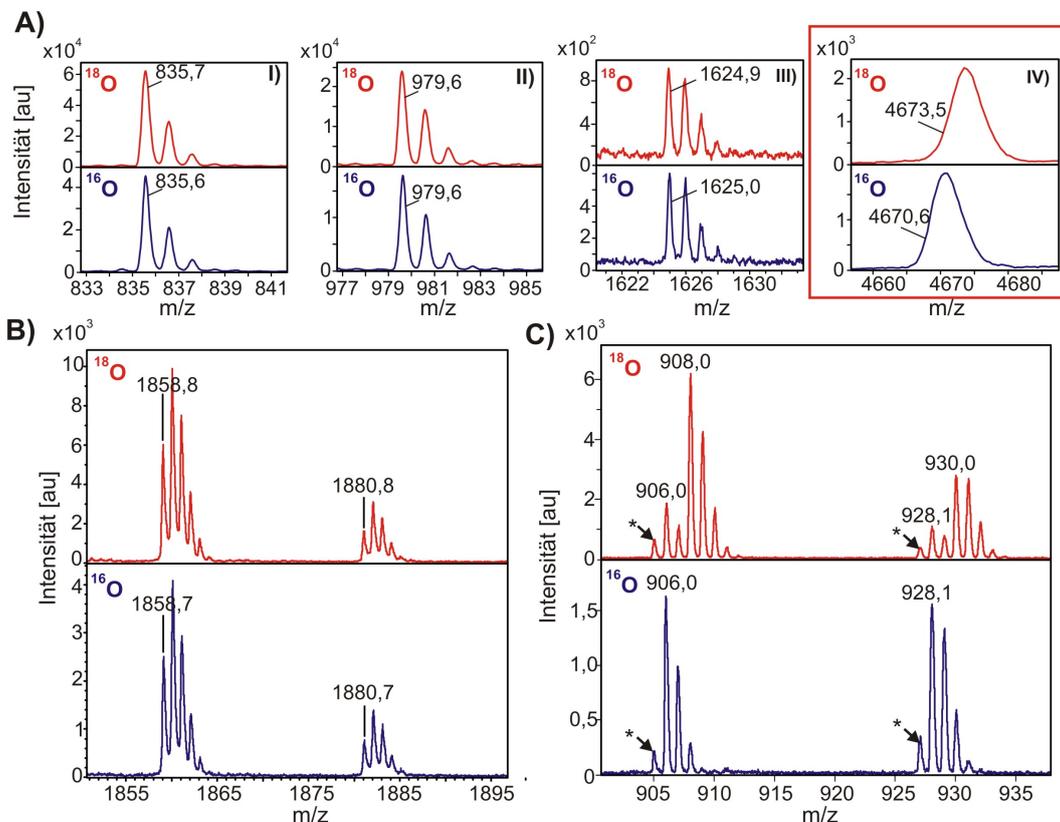


Abbildung 42. Mechanistische Untersuchungen in ^{18}O -isotopenmarkiertem Spleißpuffer. Jede Reaktion wurde in normalem Spleißpuffer (blaue Spektren) oder in einem mit ^{18}O -Isotopen angereichertem Puffer (rote Spektren) durchgeführt. **A)** Pep1 (40 μM) wurde mit dem spleißaktiven Protein 7 (11 μM) 24 h bei 25°C umgesetzt. Das Produkt Int^C (5) dieser Reaktion wurde tryptisch verdaut und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Nur das C-terminale Peptidfragment aus Aminosäuren 106-147 (IV, roter Kasten, $[\text{M}+\text{H}]^+\text{ber.} = 4670,3$ Da) zeigte den Austausch eines ^{16}O - gegen ^{18}O -Isotops, während in die anderen dargestellten Fragmente (AS 84-90 (I), AS 68-75 (II) und AS 20-32 (III)) kein ^{18}O eingebaut wurde. **B)** Auch das Spleißprodukt 8 der Reaktion aus A) wurde tryptisch verdaut und mit MALDI-TOF-MS analysiert. Das interessante Fragment der Ligationsstelle (AS 1-16, $[\text{M}+\text{H}]^+\text{ber.} = 1858,6$ Da, $[\text{M}+\text{Na}]^+\text{ber.} = 1880,6$ Da) zeigte keinen Einbau des ^{18}O -Isotops. **C)** Die Reaktion von Pep3 (40 μM) mit Mutante 7b (11 μM) wurde nach 24 h bei 25°C direkt in Lösung durch MALDI-TOF-MS analysiert. Das bei dieser Reaktion auftretende N-terminale Hydrolyseprodukt ($[\text{M}+\text{H}]^+\text{ber.} = 906,3$ Da, $[\text{M}+\text{Na}]^+\text{ber.} = 928,3$ Da) zeigte im Fall einer ^{18}O -markierten Reaktion eine Massenverschiebung um 2 Da ($[\text{M}+\text{H}]^+\text{ber.} = 908,3$ Da, $[\text{M}+\text{Na}]^+\text{ber.} = 930,3$ Da). (* Signal einer Peptidverunreinigung).

Der tryptische Verdau des Produkts 5 (Int^C) ist in Abbildung 42A dargestellt. Hier zeigte ein Peptidfragment eine deutliche Massenverschiebung, initiiert durch die Aufnahme eines ^{18}O -Wassermoleküls. Dabei handelte es sich um das C-terminale Fragment des Inteins, welches als Succinimid-Derivat abgespalten und anschließend hydrolysiert wurde. Aufgrund der Größe dieses Peptids ($[\text{M}+\text{H}]^+\text{ber.} = 4670,3$ Da) konnte in diesem Fall nicht ein isotopenaufgelöstes sondern lediglich stark verbreitertes Signal erhalten werden. Die nicht hydrolysierte Succinimidform wurde nicht detektiert.

Abschließend sollte auch das N-terminale Hydrolyseprodukt auf den Einbau von schwerem Sauerstoff hin untersucht werden. Um eine N-terminale Hydrolyse auszulösen, wurde das Referenzpeptid Pep3 (40 μM) mit der Doppelmutante **7b** (11 μM) umgesetzt und 24 h bei 25°C inkubiert werden. Der Anteil des ^{18}O -Isotops im Reaktionsansatz lag bei ca. 70%. Die Analyse der Reaktionsmischung erfolgte direkt in Lösung mittels MALDI-TOF-MS, d.h. ohne tryptischen Verdau. Hierbei konnte für das Signal des freien N-Exteins ($[\text{M}+\text{H}]^{\text{ber.}} = 906,3 \text{ Da}$) in normalem (Abbildung 42C blau) und in ^{18}O -angereichertem Puffer (Abbildung 42C rot) ein eindeutiger Massenunterschied von 2 Da detektiert werden. Die Verhältnisse des ^{16}O - zu ^{18}O -Isotops im Hydrolyseprodukt (1 zu 3) und im verwendeten Puffer (1 zu 3,3) stimmten sehr gut überein.

Zusammenfassend bestätigen die in ^{18}O -isotopenmarkiertem Puffer durchgeführten Untersuchungen die Aufnahme eines Wassermoleküls bei der C-terminalen Spaltung mit anschließender Succinimid-Hydrolyse, sowie bei der N-terminalen Hydrolysereaktion des zwischenzeitlich gebildeten Thioesters. Eine Thiazolin-Zwischenstufe, und die damit verbundene Abspaltung und Wiederaufnahme von Wasser, konnten als möglicher Mechanismus des ersten $\text{N} \rightarrow \text{S}$ -Acyltransfers im Proteinspleißen ausgeschlossen werden und bleiben damit ein Sonderfall der Spleißreaktion, welcher lediglich im Zusammenhang mit den Punktmutationen Gly[-1]Ala, Asn154Ala und Ser[+1]Ala auftritt.

5.3.6 Mechanistische Studien zur Cys1-Position mittels unnatürlicher Aminosäurebausteine

Das an Position 11 gesplattene *Ssp* DnaB Intein stellt nicht nur einen vielversprechenden neuen Ansatz zur N-terminalen Modifikation von Proteinen dar, sondern ermöglicht auch neuartige mechanistische Studien zum Proteinspleißen. Da die Int^{N} -Sequenz durch Festphasenpeptidsynthese dargestellt werden kann, können auch verschiedene unnatürliche Aminosäurebausteine und Modifikationen innerhalb dieser Sequenz eingebaut und ihr Einfluss auf das Proteinspleißen und die Komplexbildung analysiert werden. Die am höchsten konservierte Aminosäure innerhalb der Int^{N} -Sequenz ist das katalytische Cys1, welches als nukleophile Aminosäure am N-Terminus des Inteins direkt an der Ausbildung des Thioesters durch den $\text{N} \rightarrow \text{S}$ -Acyltransfer beteiligt ist (siehe Kapitel 2.1.1.1). Um die sterische Variabilität der Thiolfunktion und den Einfluss der Stereochemie an Position 1 eingehender zu untersuchen, wurde das Cys1 gegen die beiden unnatürlichen Aminosäurebausteine *DCys* (Cystein in *D*-Konfiguration) und *HCys* (*Homo*-Cystein) substituiert (Abbildung 43A). Wie in Abbildung 43B verdeutlicht, wurde bei der Umsetzung mit Protein **7** (Int^{C} -Trx-His₆) nach

24 h Inkubation bei 25°C mit beiden neuen Peptiden hauptsächlich das C-terminale Spaltprodukt **9** erhalten. Interessanterweise konnten mit Pep**23** (*HCys*) allerdings noch Spuren des Spleißprodukts **8** detektiert werden (Abbildung 43B Spur 3). Mit dem *D*-konfigurierten Cystein in Pep**24** konnte dagegen keine Spleißproduktbildung beobachtet werden (Abbildung 43B Spur 4).

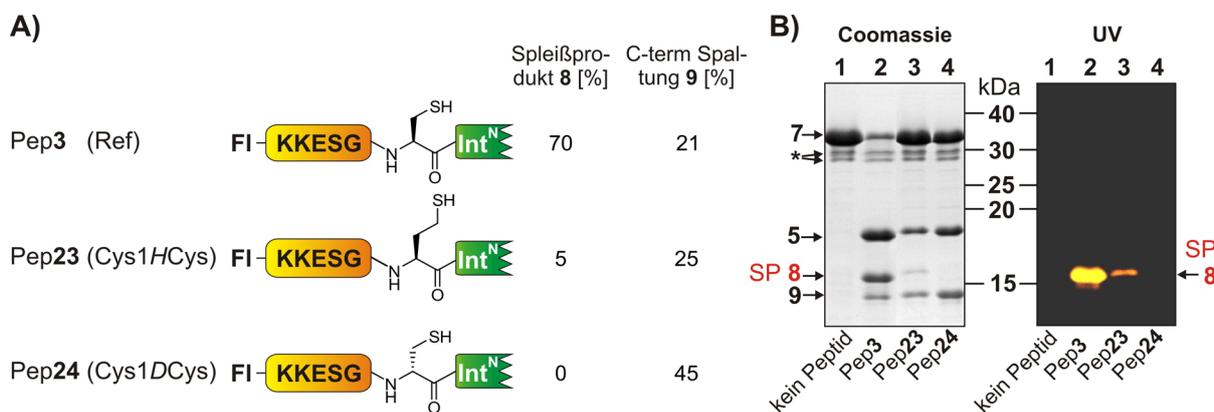


Abbildung 43. Sterische und stereochemische Variation von Cys1. **A)** Graphische Darstellung der Peptidmutanten mit einer *HomoCys*-Funktion (Pep**23**) bzw. einem Cystein in *D*-Konfiguration (Pep**24**) an Position 1. Zusätzlich sind die aus den Bandenintensitäten des Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgels ermittelten Daten der Spleißprodukt- und C-terminalen Spaltproduktbildung angegeben. **B)** Die Peptide (jeweils 68 μ M) wurden mit Konstrukt **7** (68 μ M, Int^C-Trx-His₆) bei 25°C 24 h inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (links) bzw. UV-Illumination (rechts). Das semisynthetische Spleißprodukt (SP **8**), das freigesetzte Int^C (**5**) sowie das C-terminale Spaltprodukt (**9**) sind markiert.

Auch für die Peptide Pep**23** und Pep**24** wurden weiterführende Studien zur Komplexbildung und zum $N \rightarrow S$ -Acylyltransfer durchgeführt, um den Einfluss der jeweiligen Mutation auf die einzelnen Reaktionsschritte beim *trans*-Proteinspleißen untersuchen zu können. Die SDS-PAGE-Analyse der Assoziation von Int^N und Int^C mit der Tripelmutante **7c** nach 24 h Inkubation bei 25°C ist in Abbildung 44A gezeigt. Hierbei beeinflusste weder Pep**23** (*HCys*, Abbildung 44A Spur 3) noch Pep**24** (*DCys*, Spur 4) die Bildung des fluoreszierenden Komplexes **I**. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls durch Bestimmungen der kinetischen Parameter K_d und k_{on} mittels Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen bestätigt werden (siehe Tabelle 10).

Bei der Umsetzung mit Doppelmutante **7b** hingegen (Abbildung 44B), die neben der Assoziation der Inteinfragmente auch den ersten $N \rightarrow S$ -Acylyltransfer katalysierte, zeigte die Cys1*HCys*-Mutation in Pep**23** eine vergleichbare Komplexbildung wie Referenz Pep**3** (vergleiche Spur 2 und 3). In beiden Fällen war der gebildete Komplex **II** nicht fluoreszierend, was auf die Hydrolyse des Thioesters an der N-terminalen Spleißstelle hindeutete. Aufgrund dieser Beobachtung konnte angenommen werden, dass sowohl ein 5-

gliedriger (mit Cys1) als auch ein 6-gliedriger Übergangszustand (mit *HCys*1) vergleichbar quantitativ zur Ausbildung des N-terminalen Thioesters führten (Abbildung 44C). Da bei der Umsetzung von Pep23 mit Protein 7 lediglich ca. 5% des Spleißprodukts 8 gebildet wurden (vergleiche Abbildung 43B Spur 3), musste mit diesem Peptid folglich ein späterer Reaktionsschritt im Spleißmechanismus gestört sein. Höchstwahrscheinlich handelt es sich hierbei um die intramolekulare Umesterung, da *HCys* am letzten S→N-Acyltransfer im Proteinspleißen nicht direkt beteiligt ist (siehe Reaktionsmechanismus Abbildung 3).

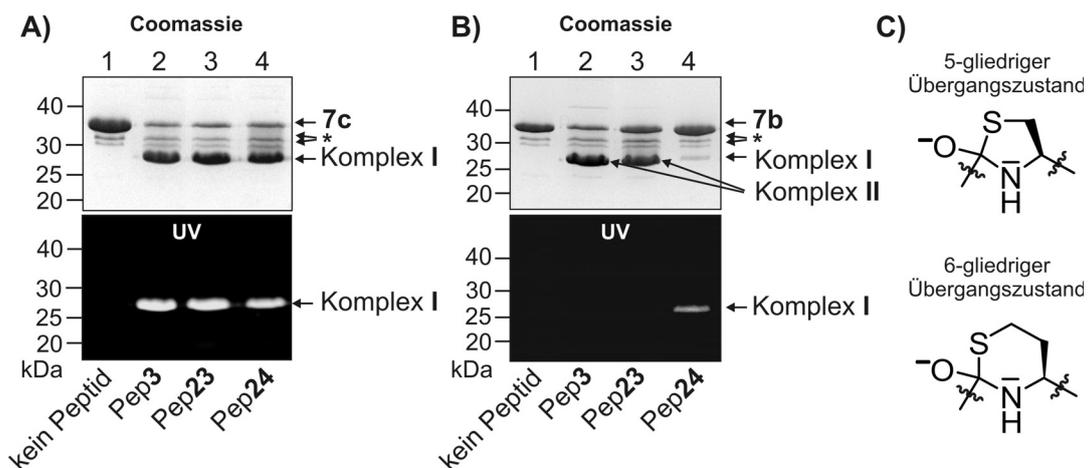


Abbildung 44. Untersuchung der Komplexbildung von Peptiden mit sterisch und stereochemisch veränderter Thiofunktion des Cys1. Die Komplexbildungseigenschaften von Pep23 (Cys1*HCys*, jeweils Spur 3) und Pep24 (Cys1*DCys*, jeweils Spur 4) wurden nach 24 h Inkubation bei 25°C mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (oben) bzw. UV-Illumination (unten) analysiert und mit der Referenz Pep3 verglichen (Spur 2). **A)** Der Umsatz mit der Tripelmutante **7c** (Peptid und Protein je 60 μ M) führte zur Ausbildung des fluoreszierenden Komplexes **I**. **B)** Die Reaktion mit Doppelmutante **7b** lieferte nur mit Pep3 und Pep23 den N-terminal hydrolysierten Komplex **II**, während mit Pep24 Spuren des fluoreszierenden Komplexes **I** gebildet wurden. **C)** Graphische Darstellung des zyklischen Übergangszustand im N→S-Acyltransfer an der N-terminalen Spleißstelle. Das native Cystein an Position 1 in Pep3 bedingt einen 5-gliedrigen, das *HCys* in Pep23 einen 6-gliedrigen Übergangszustand.

Die Komplexbildung von Pep24 (*DCys*) mit Doppelmutante **7b** lieferte ebenfalls ein interessantes Ergebnis. Wie in Abbildung 44B Spur 4 gezeigt, wurden hier nur Spuren eines unter den Bedingungen der SDS-PAGE stabilen fluoreszierenden Komplexes beobachtet. Auch MALDI-TOF-MS Untersuchungen eines solchen Reaktionsansatzes zeigten keine Bildung des N-terminalen Hydrolyseprodukts (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen machen eine inhibierende Wirkung des N→S-Acyltransfers aufgrund der veränderten Konfiguration des Cysteins an Position 1 sehr wahrscheinlich.

Tabelle 10. Kinetische Parameter der Komplexbildungsreaktion zur Untersuchung der Cys1-Position

Peptid	K_d [μM] [#]	k_{on} [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$] ^Δ	k_{off} [10^{-5}s^{-1}] [*]
Pep3 (Ref)	$1,1 \pm 0,2$	$16,8 \pm 1,0$	1,8
Pep23 (Cys1HomoCys)	$1,2 \pm 0,05$	$17,8 \pm 0,8$	2,1
Pep24 (Cys1DCys)	$0,5 \pm 0,2$	$21,2 \pm 0,9$	1,1

* k_{off} wurde aus K_d und k_{on} berechnet; [#] Fehler entspricht der Standardabweichung aus mindestens zwei Messungen; ^Δ Fehler entspricht dem Standardfehler aus der linearen Regression von k' in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

Zusammenfassend lieferte die stereochemische (Cys1DCys) und sterische (Cys1HCys) Variation der Cys1-Funktion in Kombination mit den schrittweise mutierten Proteinen **7**, **7b** und **7c** interessante mechanistische Informationen. Während eine Veränderung der Stereochemie den ersten N→S-Acyltransfer inhibiert, ist diese Reaktion von einer Verlängerung der Cysteinseitenkette um eine Methylengruppe unbeeinflusst. Stattdessen wirkt sich die Cys1HCys-Substitution störend auf die intramolekulare Umesterung aus.

6 Diskussion

6.1 Etablierung eines neuen gespaltenen Inteins zur Protein-Semisynthese

Um Informationen zur Funktion, Struktur, Dynamik, Lokalisation oder zu Interaktionspartnern eines Zielproteins zu erhalten, sind bereits eine Vielzahl chemischer, physikalischer oder molekularbiologischer Methoden etabliert worden. Allerdings muss bei vielen dieser Techniken eine selektive Markierung des Zielproteins den eigentlichen *in vitro* oder *in vivo* durchgeführten Experimenten vorausgehen. Erst durch die selektive Einbringung einer „biophysikalischen Sonde“, welche z.B. ein Fluorophor, ein Cross-Linker, eine photoaktivierbare Gruppe oder ein NMR-aktives Isotop darstellen können, gelingt es, die gewünschten Informationen zu erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine leicht anzuwendende generelle Technik zur N-terminalen Modifikation verschiedener Zielproteine etabliert. Dieser neue Ansatz basiert auf dem künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Mini-Intein, wobei sich die Spaltungsposition lediglich 11 Aminosäuren hinter dem N-Terminus befindet. Hierdurch wird ein einfacher synthetischer Zugang des N-terminalen Inteinfragments (Int^{N}) in Fusion mit einem kleinen N-Extein (Ex^{N}) durch Festphasenpeptidsynthese möglich, wobei gleichzeitig eine oder auch mehrere chemische Modifikationen eingebracht werden können. Das C-terminale Inteinfragment (Int^{C}) wird in Fusion mit dem Zielprotein (Ex^{C}) durch rekombinante Genexpression generiert. Bei einem Umsatz der synthetischen und der rekombinanten Komponente katalysiert das Intein die selektive Verknüpfung von Ex^{N} und Ex^{C} mittels einer nativen Peptidbindung und damit die Bildung des semisynthetischen Produkts. Da mittels dieser Methode nicht nur ein Teil des Spleißprodukts, sondern auch das N-terminale Inteinfragment Int^{N} synthetisch zugänglich ist, können auch in diesem Bereich relativ einfach und schnell natürliche wie unnatürliche Modifikationen eingeführt werden, was verschiedene mechanistische Studien des *trans*-Proteinspleißens ermöglichte.

6.1.1 Semisynthetische gesplattene Inteine

Neben dem semisynthetischen Intein dieser Arbeit wurden in der Literatur bereits zwei weitere gesplattene Inteine beschrieben, bei denen die Umsetzung einer synthetischen Inteinhälfte mit dem rekombinanten Gegenstück erfolgreich das semisynthetische Spleißprodukt lieferte. Im kommenden Abschnitt sollen diese Beispiele näher vorgestellt

werden, um die allgemeine Anwendbarkeitsbreite des semisynthetischen *trans*-Proteinspleißens und die Vorteile des gespaltenen *Ssp* DnaB-Inteins zu verdeutlichen.

Die erste Generierung eines semisynthetischen Inteins gelang Lew *et al.* 1998 mit dem *Mtu* RecA-Intein [140]. Die Autoren konnten zeigen, dass eine 105 Aminosäuren große rekombinante N-terminale Inteinhälfte mit einem lediglich 35 Aminosäuren umfassenden und synthetisch generierten C-terminalen Inteinfragment *in vitro* spleißaktiv war. Allerdings war eine vorangehende Denaturierungs- und Renaturierungsprozedur für diese Spleißaktivität essentiell. Die Spleißausbeute bei pH 7,5 und 30°C betrug nach 24 h Inkubation ca. 86% [139], und lag somit in der gleichen Größenordnung, wie die mit dem semisynthetischen *Ssp* DnaB-Intein erzielte Ausbeute (ca. 70%). Das erhaltene Produkt bestand im Fall des *Mtu* RecA-Inteins aus dem rekombinanten N-Extein MBP und einem aus nur zwei Aminosäuren aufgebauten C-Extein (Cys-Ala). Dieses System wurde somit nicht direkt zur Modifikation von Proteinen genutzt, sondern diente lediglich als *Proof of Principle*. Das Auftreten einer Nebenreaktion (N- oder C-terminale Spaltung) wurde im Kontext des semisynthetischen *Mtu* RecA-Inteins zwar nicht beschrieben, allerdings kann eine solche Reaktion basierend auf den veröffentlichten Daten auch nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden.

Das erste Mal in semisynthetischer Form trat das nativ gespaltene *Ssp* DnaE-Intein im Jahr 2000 in Erscheinung [137]. Xu und Mitarbeitern gelang die Synthese des 36 Aminosäuren umfassenden Int^C-Fragments mit 4 nativen C-Extein-Aminosäuren (CFNK), wobei das endständige Lysin zusätzlich mit Biotin modifiziert vorlag (Abbildung 45A). Die Umsetzung dieses Peptids mit dem rekombinanten Fusionsprotein aus MBP und Int^N (AS 1-123) wurde mittels SDS-PAGE und Westernblot (Anti-Biotin) analysiert, was zur Detektion des gewünschten Spleißprodukts (MBP-CFNK-Biotin) führte. In Analogie zur beschriebenen C-terminalen Spaltung des *Ssp* DnaB-Inteins dieser Arbeit, wurde das Auftreten einer Nebenreaktion (die N-terminale Hydrolyse) auch mit dem *Ssp* DnaE-Intein beobachtet, aber nicht quantifiziert.

Eine konkrete Anwendung fand das semisynthetische *Ssp* DnaE-Intein in der Arbeitsgruppe von Christian Becker [138]. Diese befasst sich mit der Untersuchung der spontanen Umfaltung des zelleigenen Prionproteins (PrP^C) in seine pathogene Form (PrP^{Sc}), wodurch es zur Auslösung von Krankheiten, wie der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, BSE („Rinderwahnsinn“) oder Scrapie („Traberkrankheit“), kommt. Durch die C-terminale Modifikation mit Glycosylphosphatidylinositol (GPI-Anker) lokalisieren die Prionproteine an der Zellmembran. Hier findet der bislang noch nicht verstandene Umlagerungsschritt in die pathogene Proteinform statt. Um den Einfluss der posttranslationalen Modifikation mit GPI

auf die Prionprotein-Pathogenese näher zu charakterisieren, wurde mit Hilfe des semisynthetischen *Ssp* DnaE-Inteins ein C-terminal zweifach lipidiertes Prionprotein dargestellt, wobei die doppelte Lipidierung ein Analogon zum GPI-Anker darstellte. Hierfür wurde zunächst das Prionprotein der Maus (rPrP) in Fusion mit Int^N (123 AS) in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Die Herstellung des synthetischen Gegenstücks erfolgte in zwei Schritten. So wurde zunächst das 36 AS umfassende Int^C-Fragment mittels Boc-basierter Festphasenpeptidsynthese (SPPS), inklusive einer C-terminalen Thioesterfunktion, generiert. Die ebenfalls durch SPPS erhaltene C-Exteinsequenz umfasste insgesamt 16 Aminosäuren, wobei zwei palmitoylierte Lysinreste und ein N-terminales Cystein enthalten waren. Durch eine *Native Chemische Ligation* (NCL) beider Komponenten wurde die Fusion aus Int^C und palmitoyliertem Ex^C generiert, welche bei einem Umsatz mit rPrP-Int^N schließlich das semisynthetische Produkt, ein zweifach lipidiertes Prionprotein, lieferte (Abbildung 45B).

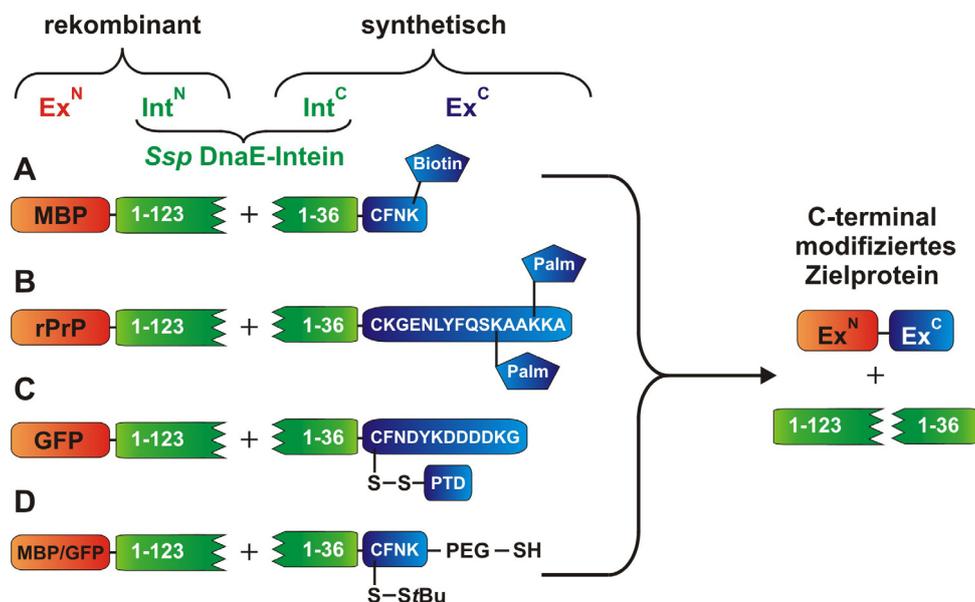


Abbildung 45. Semisynthetisches *trans*-Proteinspleißen mit dem *Ssp* DnaE-Intein. Das nativ gespleißte *Ssp* DnaE-Intein besteht aus einem 123 AS großen Int^N-Fragment und einem 36 AS umfassenden Int^C-Segment. Daraus resultiert ein synthetischer Zugang mittels SPPS lediglich für die C-terminale Hälfte. **A**) Als erste nutzten Evans *et al.* das System zur C-terminalen Modifikation des Maltose-bindenden Proteins (MBP) mit Biotin *in vitro*. **B**) Becker und Mitarbeiter verwendeten die Methode zur C-terminalen doppelten Palmitoylierung (Palm) des Prionproteins der Maus (rPrP), ebenfalls *in vitro*. **C**) Giriati und Muir gelang erstmals die C-terminale Modifikation von GFP mit dem „FLAG-Tag“ (DYKDDDDKG) in Säugetierzellen. Für den Transport des Peptids in die Zelle sorgte eine Protein-Transduktionsdomäne (PTD), welche über eine Disulfidbrücke am Cys[+1] kovalent gebunden war. **D**) Kwon *et al.* nutzten ein Int^C-Peptid mit Polyethylenglycol-Linker und einer C-terminalen Thiofunktion zur selektiven und spurlosen Immobilisierung zweier Modellproteine (GFP und MBP) auf einer Glasoberfläche.

Noch einen Schritt weiter gingen Giriati und Muir, indem sie das semisynthetische *Ssp* DnaE-Intein zur selektiven C-terminalen Modifikation von Proteinen in lebenden Zellen nutzten [73]. Hierfür wurde eine Fusion aus GFP und Int^N durch transiente Transfektion in

Säugetierzellen produziert (Abbildung 45C). Das synthetisch generierte Gegenstück bestand aus dem 36 Aminosäuren umfassenden Int^C-Fragment in Fusion mit 3 nativen C-Extein-Aminosäuren (CFN) und einem C-terminalen FLAG-Tag (DYKDDDDKG). Der Schlüssel zum Erfolg bei diesem Ansatz lag in der zusätzlichen Protein-Transduktionsdomäne (PTD, bestehend aus 17 AS), mit der das Int^C-FLAG-Peptid über eine Disulfidbrücke kovalent verbunden war. Nach Zugabe dieses Peptids direkt zum Medium der CHO-Zellen initiierte die PTD den Transport der Verbindung durch die Membran in das Cytosol der Zelle. Hier wurde aufgrund der reduzierenden Bedingungen die PTD abgespalten, das katalytische Cys[+1] freigelegt und die Spleißreaktion katalysiert.

Schließlich nutzten Camarero und Mitarbeiter das semisynthetische *Ssp* DnaE-Intein zur selektiven Immobilisierung von Zielproteinen auf einer festen Oberfläche [36]. Hierfür synthetisierten sie das in Abbildung 45D dargestellte Int^C-Peptid, welches neben den vier nativen C-Extein-Aminosäuren (CFNK) mit einem Polyethylenglycol-Linker (PEG) und einer C-terminalen Thiolgruppe ausgestattet war. Mittels dieser Thiolfunktion konnte das Peptid selektiv auf einer Maleinimid-funktionalisierten Glasoberfläche immobilisiert werden, allerdings nur unter der Voraussetzung, dass die Seitenkette des katalytischen Cys[+1] noch mit einer *S-tert*-Butylgruppe geschützt vorlag. Nach erfolgter Immobilisierung wurde diese Schutzgruppe mit 50% β -Mercaptoethanol in DMF entfernt und durch die Zugabe des Int^N-Fusionsproteins die Spleißreaktion gestartet. Auf diese Weise konnten die beiden Modellproteine MBP und GFP regioselektiv auf einer festen Oberfläche immobilisiert werden. Da während der Spleißreaktion beide Inteinfragmente freigesetzt werden ermöglicht diese Methode eine „spurlose“ Immobilisierung.

Während bei allen vorgestellten Beispielen die synthetische Modifikation lediglich am C-Terminus erfolgen kann, stellt das gesplattene Intein dieser Arbeit das erste System zur Protein-Semisynthese am N-Terminus eines Zielproteins dar. Weiterhin verdeutlichen die Beispiele mit dem *Mtu* RecA- und dem *Ssp* DnaE-Intein einen entscheidenden Nachteil: Die benötigten Peptidlängen der C-terminalen Inteinfragmente (35 AS bzw. 36 AS) liegen bereits in einem Synthesebereich, der keinesfalls einfach zugänglich ist. Lediglich mit optimierten Syntheseprotokollen oder anderen Hilfsmitteln, wie z.B. NCL [138], kann das gewünschte Peptid in zufriedenstellenden Ausbeuten dargestellt werden. Die Etablierung des an Position 11 gesplatteten *Ssp* DnaB-Inteins, und die damit verbundene Verkürzung des Inteinfragments, stellen somit eine entscheidende Verbesserung dar und machen das semisynthetische *trans*-Proteinspleißen wesentlich leichter zugänglich.

Daher war es nicht verwunderlich, dass ein Jahr nach der Veröffentlichung der neuen *in vitro* Methode dieser Arbeit [169] Ando *et al.* das gesplattene *Ssp* DnaB-Intein zur N-terminalen Modifikation von Proteinen auf der Zelloberfläche weiterentwickelten [170]. Da die Autoren für die in einem submikromolaren Konzentrationsbereich durchgeführte Spleißreaktion mit dem semisynthetischen *Ssp* DnaB-Intein keine Spleißproduktbildung detektieren konnten, sollte die Affinität der Inteinfragmente mit Hilfe einer zusätzlich eingeführten Liganden/Rezeptor-Bindung erhöht werden. Als Ligand diente in diesem Zusammenhang Trimethoprim (TMP) und als Rezeptor wurde die Dihydrofolatreduktase aus *E. coli* (DHFR) genutzt. Die Komplexbildung dieser beiden Interaktionspartner kann mit einer Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich beschrieben werden.

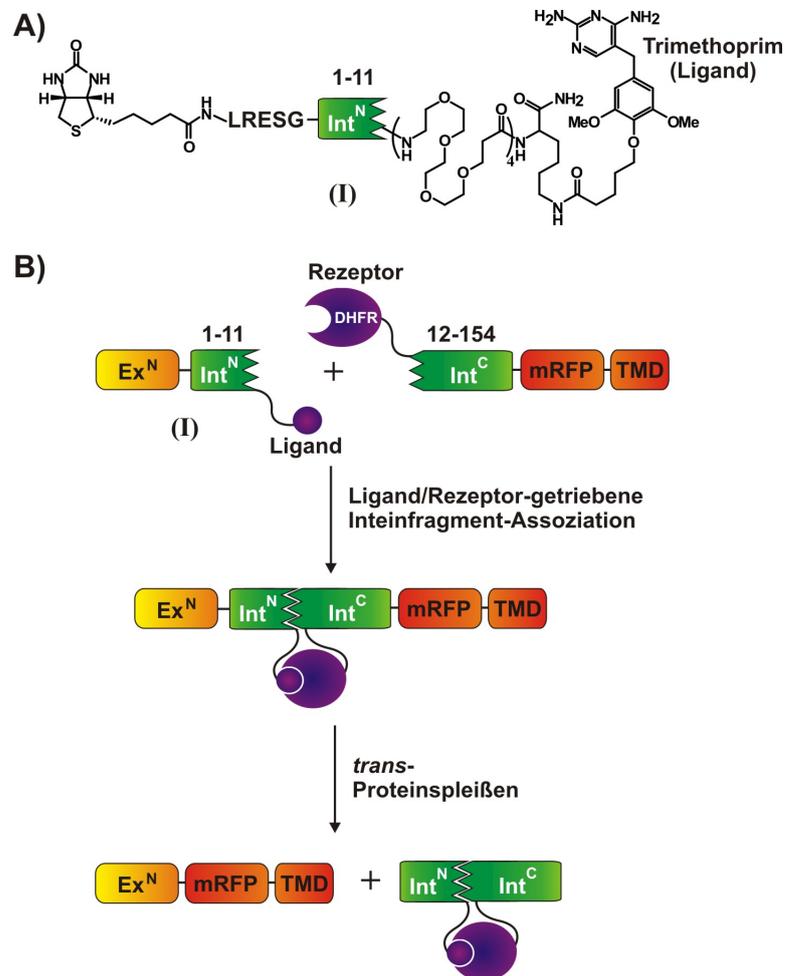


Abbildung 46. Erhöhung der Affinität von Int^N und Int^C mittels einer Ligand/Rezeptor-Bindung. In einer Arbeit von Ando *et al.* wurde das semisynthetische *Ssp* DnaB-Intein weiterentwickelt und zur selektiven Modifikation des monomeren rot-fluoreszierenden Proteins (mRFP) auf Zelloberflächen eingesetzt. **A)** Die Int^N-Sequenz wurde in Fusion mit 5 N-Extein-Aminosäuren, einer N-terminalen Biotin- und einer C-terminalen Trimethoprim-Modifikation (Ligand) synthetisiert. **B)** Das Fusionsprotein aus Dihydrofolatreduktase (DHFR, Rezeptor), Int^C(12-154), dem Zielprotein mRFP und einer Transmembran-Domäne (TMD) wurde durch transiente Transfektion in CHO-Zellen generiert und lokalisierte aufgrund der TMD an der Zelloberfläche. Hier konnte die semisynthetische Spleißreaktion mit Peptid I durchgeführt werden.

Für die Umsetzung dieses Ansatzes wurde das in Abbildung 46A dargestellte Peptid synthetisiert. Der Trimethoprim-Ligand wurde hierbei über eine Linkersequenz, bestehend aus vier aufeinanderfolgenden PEG₄-Aminosäuren, an den C-Terminus der Int^N(1-11)-Sequenz kovalent gebunden. Weiterhin wurde eine Biotin-Modifikation am N-Terminus der fünf Aminosäuren umfassenden N-Exteinssequenz eingeführt. Als Zielprotein diente das monomere rot-fluoreszierende Protein (mRFP) (siehe Abbildung 46B). Das Fusionsprotein aus Dihydrofolatreduktase (Rezeptor), Int^C(12-154), mRFP und einer Transmembran-Domäne (TMD), welche zur Lokalisation des Proteins auf der Zelloberfläche diente, wurde durch transiente Transfektion in CHO-Zellen generiert. Die Zugabe des Int^N-Peptids (**I**) erfolgte direkt ins Wachstumsmedium der Zellen. Nach 8 h Inkubation konnte eine selektive Modifikation der Zellmembran mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Damit gelang Ando *et al.* das semisynthetische *trans*-Proteinspleißen mit dem an Position 11 gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein auf der Oberfläche von Säugetierzellen, während die selektive N-terminale Modifikation innerhalb einer Zelle noch aussteht.

6.1.2 Gegenüberstellung von EPL und semisynthetischem *trans*-Proteinspleißen

Im kommenden Abschnitt soll das semisynthetische *trans*-Proteinspleißen mit anderen, in der Literatur bereits bekannten Techniken zur Rückgrat-Protein-Semisynthese, d.h. zur Verknüpfung eines Peptids und eines Proteins über eine native Peptidbindung, verglichen werden. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Ausarbeitung der Vor- und Nachteile im Vergleich zur *Expressed Protein Ligation* (EPL) gelegt, da letztere die am häufigsten verwendete chemische Ligationstechnik darstellt.

Ganz allgemein können sowohl mit EPL als auch mit dem semisynthetischen *trans*-Proteinspleißen verschiedene Zielproteine mit verschiedensten Modifikationen selektiv und kovalent ligiert werden, d.h. beide Techniken zeichnen sich durch ihre große Anwendungsbreite aus [13]. Durch den vollsynthetischen Zugang zu einem Peptidsegment innerhalb des Ligations- bzw. des Spleißprodukts können eine Vielzahl unnatürlicher Aminosäuren oder chemischer Modifikationen gleichzeitig eingeführt werden, was einen wichtigen Vorteil z.B. im Vergleich zur „Nonsense-Codon-Unterdrückung“ darstellt (siehe Kapitel 2.2.1).

6.1.2.1 Die flankierenden Aminosäuren der Ligationsstelle

Die Spleißreaktion ist ein sehr komplexes Zusammenspiel mehrerer nukleophiler Umlagerungen, welche für eine erfolgreiche Spleißproduktbildung hoch koordiniert erfolgen müssen und nur durch ein korrekt gefaltetes Intein bewerkstelligt werden können. Nicht-native flankierende Aminosäuren an der N- und C-terminalen Spleißstelle können sich hierbei störend bemerkbar machen. Bereits in verschiedenen Untersuchungen wurde ein solcher Effekt beschrieben, wobei die Spleißproduktbildung in jedem Fall störungsanfälliger reagierte als die N- bzw. die C-terminale Spaltungsreaktion [26, 27, 38, 171]. Weiterhin bemerkenswert ist das sehr unterschiedliche Verhalten verschiedener Inteine, was ein Aufstellen generell gültiger Regeln zur Toleranz der Inteine gegenüber nicht-nativen flankierenden Aminosäuren so gut wie unmöglich macht. Allgemein ist für die Durchführung einer erfolgreichen Spleißreaktion der Einbau von zwei bis fünf nativen flankierenden Aminosäuren empfehlenswert. Sollte das die jeweilige Anwendung allerdings nicht zulassen, so kann nur durch ein experimentelles Austesten die Anwendbarkeit der Methode für die jeweilige Exteinsequenz und das jeweilige verwendete Intein festgestellt werden.

Die EPL ist in diesem Zusammenhang etwas flexibler und toleriert eine größere Anzahl verschiedener Aminosäurefunktionen an der Ligationsstelle. Allerdings gibt es auch hier einige Einschränkungen, die berücksichtigt werden sollten. In den folgenden zwei Kapiteln soll der Einfluss der beiden die Ligationsstelle direkt flankierenden Aminosäuren eingehend diskutiert werden.

Die Variabilität der Aminosäurefunktion an Position [+1]

Sowohl bei der EPL als auch beim *trans*-Proteinspleißen ist die C-terminale Aminosäure an der Ligationsstelle nicht frei wählbar. Beim Proteinspleißen muss hier eine Aminosäure mit nukleophiler Seitenkette lokalisiert sein, d.h. ein Cystein-, Serin- oder Threoninrest. Je nach verwendetem Intein kann zwischen diesen Aminosäuren eventuell eine gewisse Variation möglich sein. So konnte Pia Jeggle im Rahmen ihrer Bachelorarbeit zeigen, dass auch ein *Ssp* DnaB-Int^C-Fusionsprotein mit einer Cysteinfunktion an Position [+1] zur Ausbildung des semisynthetischen Spleißprodukts befähigt war, allerdings nur mit Defiziten in der Spleißausbeute [165]. Neben einigen weiteren Beispielen dieser Art [45, 172] bleibt festzuhalten, dass beim *trans*-Proteinspleißen die Position [+1] lediglich in einem sehr kleinen Rahmen variabel ist.

Wie bereits erwähnt, ist auch die *Expressed Protein Ligation* in ähnlicher Weise eingeschränkt. Zunächst war eine N-terminale Cysteinfunktion (entspricht Position [+1]) beim

Proteinspleißen) essentiell, und erst im Laufe der letzten Jahre konnten verschiedene Methoden etabliert werden, mit deren Hilfe auch Cystein-freie chemische Ligationen möglich sind. So kann z.B. das Cystein nach der Ligation durch Desulfurierung in ein Alanin überführt werden, was allerdings nicht regioselektiv, sondern mit jedem vorhandenem Cystein innerhalb des Zielproteins erfolgt [128]. Wenn das C-terminale Fragment der EPL synthetisch generiert wird, ist es möglich mit einer Thiol-Hilfsgruppe (Auxiliar) zu arbeiten, welche nach erfolgter Peptidknüpfung entfernt werden kann [131, 132, 173, 174]. Allerdings ist in einem solchen Fall mit einer Komplikation der Synthese der Ausgangsverbindungen und/oder einer Verringerung der Produktausbeute und der Reaktionsgeschwindigkeit zu rechnen. An dieser Stelle können weitere alternative Ligationstechniken, wie z.B. die „Spurlose Staudinger Ligation“ (Kapitel 2.2.3.1) oder die „reverse Proteolyse“ (2.2.3.3) erwähnt werden. Bei diesen beiden Ansätzen sind die flankierenden Aminosäuren der Ligationsstelle prinzipiell frei wählbar. Dafür beinhalten diese Methoden aber entscheidende Defizite in Punkten wie Produktausbeute und Anwendungsbreite, so dass in den allermeisten Fällen bislang EPL die bevorzugte Methode der Wahl ist.

Der Einfluss der Aminosäurefunktion an Position [-1] auf die Spleißproduktbildung

Wie im Rahmen dieser Arbeit mit dem an Position 11 und 104 gespaltenen *Ssp* DnaB-Intein gezeigt, konnten mit einer Gly[-1]Ala-Mutation nur noch Spuren des jeweiligen Spleißprodukts detektiert werden (Kapitel 5.3.2 und 5.3.3). Auch Mathys *et al.* beobachteten bei einer solchen Gly[-1]Ala-Substitution im *cis*-spleißenden *Ssp* DnaB-Intein nur noch 20% Spleißproduktbildung *in vivo*, während mit den Gly[-1]Leu oder Gly[-1]Pro-substituierten Konstrukten jegliche Spleißaktivität inhibiert wurde [26]. Im Gegensatz hierzu berichteten Kinsella *et al.* von der Darstellung einer „Pentapeptid-Bibliothek“, bei der das an Position 104 gespalte *Ssp* DnaB-Intein zur Zyklisierung von Pentapeptiden mit Aminosäuren wie Valin, Isoleucin, Tryptophan, Phenylalanin, Arginin, Serin oder Glutamat an Position [-1] eingesetzt wurde [175]. Allerdings wurde im Rahmen dieser Veröffentlichung kein eindeutiger Nachweis für eine erfolgreiche Zyklisierung erbracht, so dass diese Daten durchaus kritisch betrachtet werden müssen.

Bei einer systematischen Substitution des nativen Gly[-1] im *Sce* VMA-Intein gegen die 19 anderen proteinogenen Aminosäuren zeigte sich die Position [-1] flexibel. Lediglich 5 Mutationen erzeugten *in vivo* durch *cis*-Proteinspleißen kein Spleißprodukt (Val, Leu, Ile, Asn und Pro) [38]. Auch die Variabilität der Position [-1] im *Mxe* GyrA-Intein wurde bereits eingehend untersucht. Für eine vergleichbare *cis*-Spleißaktivität konnte in diesem Fall das

native Tyr[-1] lediglich gegen die verwandte Aminosäure Phenylalanin substituiert werden, während 10 der 20 proteinogenen Aminosäuren nur noch weniger als 10% Spleißprodukt *in vivo* lieferten [27]. Zusammenfassend sind also große Unterschiede bezüglich der Toleranz der Aminosäurefunktionen an Position [-1] festzustellen, so dass jedes Intein individuell betrachtet und charakterisiert werden muss.

Im Gegensatz hierzu ist die entsprechende N-terminale Aminosäure an der Ligationsstelle der chemoselektiven *Expressed Protein Ligation* flexibler wählbar. Lediglich die β -verzweigten und damit sterisch anspruchsvollen Aminosäuren Ile und Val sowie Pro sollten direkt vor der α -Thioesterfunktion vermieden werden, da sie den nukleophilen Angriff des N-terminalen Thioesters abschirmen und damit die Reaktionsgeschwindigkeit stark verlangsamen können [176].

6.1.2.2 Vorteile des semisynthetischen *trans*-Proteinspleißens

Bei einem direkten Vergleich von EPL und semisynthetischem *trans*-Proteinspleißen werden drei Vorteile letzterer Technik deutlich. Erstens handelt es sich beim *trans*-Proteinspleißen um eine katalysierte Reaktion, bei der die beiden Fragmente des „single-turn-over“ Enzyms, des Inteins, mit einer hohen Selektivität und Affinität interagieren. Aufgrund dieser Eigenschaft kann das semisynthetische *trans*-Proteinspleißen auch bei Konzentrationsbedingungen im mikromolaren Bereich erfolgreich ablaufen. EPL entspricht im Gegensatz hierzu einer bimolekularen chemischen Reaktion, welche für eine gute Ausbeute Konzentrationen beider Reaktionspartner im hohen mikromolaren bis millimolaren Bereich erfordert. Zweitens ist durch die hohe Selektivität, mit der beide Inteinfragmente beim Proteinspleißen assoziieren, auch eine Anwendung in komplexen Umgebungen möglich. So konnte mit dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten semisynthetischen Intein eine selektive N-terminale Modifikation des Zielproteins im *E. coli*-Zellextrakt durchgeführt werden (siehe Kapitel 5.1.8). Ando *et al.* nutzten die neue Technik bereits zur selektiven Modifikation von Proteinen auf Zelloberflächen [170], während Giriat und Muir mit dem semisynthetischen *Ssp* DnaE-Intein Proteine in lebenden Zellen selektiv C-terminal markierten [73]. An dieser Stelle sei der Vollständigkeit halber erwähnt, dass auch EPL in lebenden Zellen bereits angewendet wurde [177, 178], wobei allerdings unspezifische Nebenreaktionen nicht vermieden werden können. Der dritte wichtige Vorteil beim semisynthetischen *trans*-Proteinspleißen liegt im formellen Austausch der für die EPL essentiellen reaktiven Gruppen (C-terminaler Thioester und N-terminales Cystein) gegen die

beiden Inteinfragmente (Int^{N} und Int^{C}). Besonders die Darstellung des Thioesters, sei es rekombinant oder synthetisch, ist oftmals schwierig umzusetzen (siehe Kapitel 2.2.3.2). Die Verlängerung einer Polypeptidkette um die 11 proteinogenen Aminosäuren der Int^{N} -Sequenz ist dagegen relativ einfach auf synthetische (SPPS) wie auch rekombinante Weise (genetisch-codiert) durchführbar. Bei einem rekombinanten Ansatz hat die sehr kleine Int^{N} -Sequenz zusätzlich den Vorteil, dass hier der Einfluss auf Faltung, Funktion und Löslichkeit des N-Exteins minimal sein sollte.

6.1.3 Löslichkeitseigenschaften des C-terminalen Inteinfragments

Beim Umgang mit großen ungefalteten Proteinfragmenten stellt das Auftreten von unlöslichen, aggregierenden oder inaktiven Konstrukten oftmals ein typisches Verhalten dar. Auch das C-terminale Inteinfragment (Int^{C}) dieser Arbeit gehört in diese Kategorie eines wahrscheinlich in großem Maße ungefalteten Proteinfragments. Die gute Löslichkeit der Fusion aus Int^{C} und Thioredoxin war vor diesem Hintergrund eine positive Überraschung und könnte auf eine zumindest partielle Vorfaltung des Int^{C} -Fragments hinweisen. Allerdings konnte ein aggregierender Effekt des Int^{C} -Fragments in Fusion mit anderen Zielproteinen (z.B. β -Lactamase) dennoch beobachtet werden, d.h. nach Expression in *E. coli* befanden sich diese Konstrukte in der unlöslichen Zellfraktion. Verschiedene Versuche die Löslichkeitseigenschaften des Int^{C} -Fragments zu verbessern, indem entweder die native Endonukleasedomäne als Faltungshelfer inseriert oder eine sukzessive N-terminale Verlängerung von Int^{C} (12-154) über Int^{C} (6-154) und Int^{C} (3-154) bis zu Int^{C} (2-154) getestet wurde, brachten leider nicht den gewünschten Erfolg. Bei dem Fragment Int^{C} (2-154) trat sogar bereits vor der Int^{N} -Zugabe eine autokatalytische C-terminale Spaltungsaktivität auf.

Interessanterweise gelang die Reinigung des unlöslichen Int^{C} - β -Lactamase Fusionsproteins (Konstrukt **10**) unter denaturierenden Bedingungen. Durch einen anschließenden Rückfaltungsschritt mittels Dialyse konnte das Int^{C} -Fragment wieder in seine lösliche und spleißaktive Form überführt werden (siehe Kapitel 5.1.5.2). Dieses Ergebnis erweitert die Anwendungsbreite der semisynthetischen Methode somit auch auf solche Zielproteine, die nur unter denaturierenden Bedingungen gereinigt aber anschließend rückgefaltet werden können. Eine Verallgemeinerung dieser Schlussfolgerung ist allerdings nicht möglich, da neben einigen positiven Beispielen (z.B. Trx, β Lac, GrsA A-PCP, gpD) auch manche Fusionen aus Int^{C} und dem Zielprotein trotz dieses Denaturierungs- und Renaturierungsschritts nicht spleißaktiv waren (siehe Kapitel 5.1.6). Demzufolge kann nur

eine gesonderte experimentelle Betrachtung jedes neuen Zielproteins Aufschluss darüber geben, ob dieses Protein in Fusion mit Int^C exprimiert und gereinigt werden kann und anschließend auch spleißaktiv ist.

Während die semisynthetische Spleißreaktion unter nativen Bedingungen erfolgen muss, da nur hier die Rekonstitution des Inteins stattfinden kann, beinhaltet die *Expressed Protein Ligation* den Vorteil, dass die eigentliche Ligationsreaktion auch unter denaturierenden Bedingungen erfolgen kann, z.B. in 8 M Harnstoff-haltigem Puffer. Eine komplette Denaturierung der beteiligten Proteine kann sogar zu einer Verbesserung der Ligationsausbeute beitragen, da in diesem Fall eine sterische Abschirmung der beiden reaktiven Funktionalitäten (α -Thioester und N-terminales Cystein) minimiert wird. Zur Darstellung eines funktionellen semisynthetischen Proteins ist allerdings auch bei der EPL unter denaturierenden Bedingungen ein finaler Rückfaltungsschritt mittels Dialyse unumgänglich.

6.2 Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen den semisynthetischen Inteinfragmenten

6.2.1 Der „Alanin-Scan“ und Vergleiche mit Int^N(1-11)-Sequenzen anderer Inteine

Die spontane Komplementation des synthetischen Inteinfragments Int^N und des rekombinanten Proteinsegments Int^C stellt ein durchaus ungewöhnliches biochemisches Phänomen dar (siehe auch Kapitel 6.4). Um diese außergewöhnliche Interaktion näher zu charakterisieren, wurde die Int^N(1-11)-Sequenz des *Ssp* DnaB-Inteins einem „Alanin-Scan“ unterzogen. Hierfür wurde sukzessive jede enthaltene Aminosäure gegen Alanin substituiert (außer Ala11), und anschließend die katalytische Aktivität durch die Analyse der Komplexbildung, des N \rightarrow S-Acyltransfers und der Spleißproduktbildung untersucht. Auf diese Weise konnten drei hydrophobe Aminosäuren identifiziert werden, welche für die Ausbildung des Komplexes zwischen den Inteinfragmenten von essentieller Bedeutung sind: Ile2, Ile8 und Leu10. Eine Analyse der von Ding *et al.* publizierten Kristallstruktur des *Ssp* DnaB-Inteins [47] zeigte, dass zusammen mit dem Int^C-Fragment die Aminosäuren Ile2 und Ile8 an der Ausbildung eines hydrophoben Inteinkerns beteiligt sind (siehe Abbildung 47A). Auch Leu10 interagiert mit Val17 über eine hydrophobe Wechselwirkung, allerdings findet diese Interaktion eher an der Oberfläche des Inteins statt. Eine Mutation der vierten hydrophoben Aminosäure im Int^N (Leu7) führte zu einem immer noch spleißaktiven Peptid,

wenn auch mit deutlichen Defiziten in der Spleißausbeute (ca. 25% statt 70%). Im Gegensatz zu den drei inaktiven Mutationen ist Leu7 vom Intein weg nach außen gerichtet (Abbildung 47, rote Aminosäure), so dass für diese solvensexponierte Aminosäure keine hydrophobe Interaktion beschrieben werden kann. Ein Vergleich der ersten 11 Aminosäuren aller in dieser Arbeit namentlich erwähnten Inteine zeigt, dass neben dem katalytisch essentiellen Cys1 auch die beiden hydrophoben Position 2 und 8 auffallend homolog sind (Abbildung 47B).

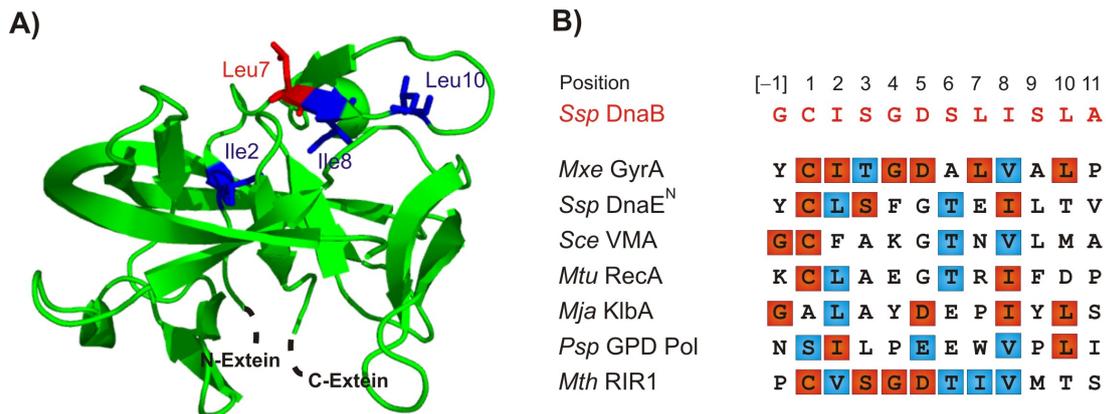


Abbildung 47. Identifikation der essentiellen Aminosäuren innerhalb der Int^N-Sequenz im *Ssp* DnaB-Intein. **A)** Im Rahmen eines „Alanin-Scans“ der Int^N-Sequenz konnten drei spleißinaktive Peptidmutanten identifiziert werden, welche die Mutationen Ile2Ala, Ile8Ala und Leu10Ala enthielten (blau dargestellt). Anhand ihrer Lokalisation innerhalb der *Ssp* DnaB-Kristallstruktur konnte diesen drei Aminosäuren eine Interaktion mit anderen hydrophoben Aminosäuren des Int^C-Fragments zugeordnet werden. Die vierte hydrophobe und spleißaktive Aminosäure Leu7 (rot dargestellt) ist an einer hydrophoben Wechselwirkung nicht beteiligt. Diese Abbildung wurde mittels der PDB-Datei 1MI8 erstellt [47]. **B)** Vergleich der Aminosäuresequenzen von Position [-1] bis Position 11 aller in dieser Arbeit erwähnten Inteine. Aminosäuren, die identisch zur *Ssp* DnaB-Int^N-Sequenz sind, wurden rot unterlegt; homologe Aminosäuren sind blau hervorgehoben.

Weiterhin konnten mit Hilfe des „Alanin-Scans“ drei Aminosäuren identifiziert werden, deren Mutationen zu Alanin keinen Einfluss auf Komplexbildung oder Spleißaktivität hatten. Hierbei handelte es sich um die drei Serinreste an Position 3, 6 und 9. Interessanterweise ist die solvensexponierte Position 9 im Vergleich mit anderen Inteinsequenzen sehr variabel (Abbildung 47B), während an den Positionen 3 und 6 doch eine gewisse Präferenz für Serin oder Threonin vorhanden ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch eine C-terminale Verlängerung der Int^N-Sequenz um mehrere Aminosäuren ohne einen nennenswerten Verlust der Spleißproduktbildung möglich ist (Kapitel 5.2.2). Ando *et al.* synthetisierten bereits eine um einen Trimethoprim-Liganden signifikant verlängerte Int^N(1-11)-Sequenz und induzierten mit diesem Peptid erfolgreich *trans*-Proteinspleißen auf Zelloberflächen (siehe Kapitel 6.1.1). Demzufolge eignet sich der C-Terminus des Int^N-Fragments hervorragend zur Einbringung verschiedener chemischer

Die Geschwindigkeitskonstante der gesamten Spleißreaktion

Die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstante der Spleißreaktion ($k_{\text{Splei\ss}}$) basierte auf densitometrischen Analysen der Bandenintensitäten von Edukt- und Produktproteinen im Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel. Bei der kinetischen Analyse des Proteinspleißens ist im Allgemeinen zu berücksichtigen, dass ein Intein ein „single-turn-over-Enzym“ darstellt, d.h. das Intein kann sich nur ein einziges Mal aus seinem Vorläuferprotein ausschneiden und dabei seine beiden kovalent gebundenen „Substrate“, die Exteine, miteinander ligieren. Als Referenzsystem dieser Arbeit diente das fluoreszierende Peptid Pep3 (Fl-KKESG-Int^N) und das Fusionsprotein aus Int^C und Thioredoxin (Konstrukt 7). Bei Reaktionen mit variierenden Pep3-Konzentrationen konnte eine lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet und eine Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung von $k_{\text{Splei\ss}} = 0,8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ermittelt werden.

Im Gegensatz hierzu wurde für alle bislang kinetisch charakterisierten gespaltenen Inteine eine solche lineare Abhängigkeit nicht detektiert und lediglich Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung bestimmt (siehe Tabelle 11). Diese betragen für das nativ gesplattene *Ssp* DnaE-Intein $k_{\text{Splei\ss}} = 6,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ [162], für das mit Dimerisierungsdomänen ausgestattete *Sce* VMA-Intein $k_{\text{Splei\ss}} = 9,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ [55] und für das an der Insertionsposition der Endonuklease gesplattene *Ssp* DnaB-Intein $k_{\text{Splei\ss}} = 9,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ [55]. Die bislang größte Geschwindigkeitskonstante einer Spleißreaktion wurde für das nativ gesplattene *Npu* DnaE-Intein mit $k_{\text{Splei\ss}} = 4,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ gemessen [179]. Bei allen diesen genannten Beispielen verläuft die Assoziation der Inteinfragmente sehr schnell, wodurch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Spleißmechanismus (wahrscheinlich die intramolekulare Umesterung) einer unimolekularen Reaktion entspricht und durch eine Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung beschrieben werden kann. Mit dem semisynthetischen Intein dieser Arbeit verläuft die Inteinfragment-Assoziation dagegen bedeutend langsamer, so dass das Proteinspleiß hier erstmals durch eine Reaktion zweiter Ordnung beschrieben werden kann.

Tabelle 11. Übersicht der bestimmten Geschwindigkeitskonstanten für das *trans*-Proteinspleiß mit verschiedenen gespaltenen Inteinen.

Intein	Größe Int ^N	Größe Int ^C	$k_{\text{Splei\ss}}$
<i>Ssp</i> DnaE	123 AS	36 AS	$6,6 (\pm 1,3) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ [162] [#]
<i>Sce</i> VMA	184 AS	65 AS	$9,4 (\pm 2,0) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ [55] [*]
<i>Ssp</i> DnaB (Spaltung an Position 104)	104 AS	48 AS	$9,9 (\pm 0,8) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ [55] [*]
<i>Npu</i> DnaE	102 AS	36 AS	$4,7 (\pm 0,4) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ [179] [*]
semisynthetisches <i>Ssp</i> DnaB (Spaltung an Position 11)	11 AS	143 AS	$0,8 (\pm 0,1) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [*]

[#] Reaktionsbedingungen: 100 mM Tris-Puffer, 500 mM NaCl, pH 7,0 und 23°C.

^{*} Reaktionsbedingungen: 50 mM Tris-Puffer, 300 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7,0 und 25°C.

Die Reaktionskinetik der Inteinfragment-Assoziation

Um die Wechselwirkung zwischen den Inteinfragmenten quantitativ beschreiben zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein „Interaktions-Assay“ etabliert, welcher auf der bei dieser Reaktion auftretenden zeitlichen Veränderung der Fluoreszenz-Anisotropie basiert. Hierfür war die Verwendung einer Tripelmutante des Int^C-Fusionsproteins (**7c**) essentiell, da durch die Mutation dreier katalytischer Aminosäuren (H73A, N154A und S[+1]A) die Assoziation der Inteinfragmente isoliert von allen weiteren Schritten des Spleißmechanismus analysiert werden konnte. Auf diesem Weg wurde für das Referenzsystem (Pep3 mit **7c**) eine konzentrationsabhängige Geschwindigkeitskonstante der Assoziation von $k_{\text{on}} = 16,8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und eine Dissoziationskonstante von $K_{\text{d}} = 1,1 \text{ }\mu\text{M}$ ermittelt. Der dritte kinetische Parameter k_{off} wurde aus K_{d} und k_{on} berechnet und betrug $k_{\text{off}} = 1,8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Die Halbwertszeit dieser Dissoziation lag damit bei 10,7 h. Im Vergleich hierzu betrug die Halbwertszeit der Assoziation im verwendeten Konzentrationsbereich von ca. 50 μM nur 13,8 min. Die Assoziation des semisynthetischen *Ssp* DnaB-Inteins lässt sich demzufolge durch einen langsamen k_{on} -Wert charakterisieren, welcher zusammen mit dem noch deutlich langsameren k_{off} -Wert zu einer Dissoziationskonstante im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich führt und damit einen Erklärungsansatz für die selbst unter SDS-PAGE Bedingungen gegebene Stabilität der Komplexe liefert.

Bei der Interpretation der Daten zur Assoziation von Int^N(1-11) und Int^C(12-154) ist es wichtig, die Tatsache nicht außer Acht zu lassen, dass beide Inteinfragmente aus einer künstlichen Spaltung hervorgegangen sind und somit höchstwahrscheinlich in großem Maße ungefaltet vorliegen. Strukturelle Untersuchungen mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) deuten darauf hin, dass sowohl das C-terminale Inteinfragment des künstlich gespaltenen *Ssp* DnaB-Inteins dieser Arbeit als auch die Fragmente des natürlich gespaltenen *Npu* DnaE-Inteins ohne die jeweils komplementäre Inteinhälfte keine definierte Struktur aufweisen (unpublizierte Daten von Joachim Zettler). Daher wäre es irreführend diese Interaktion mit der Protein-Liganden Wechselwirkung eines Enzyms zu vergleichen. Stattdessen sollte die Wechselwirkung unter den Gesichtspunkten einer Rekonstitution der Proteinstruktur mit anschließend katalysierter Produktbildung betrachtet werden, was große strukturelle Umlagerungen und eventuell auch die Ausbildung mehrere Komplexzwischenstufen beinhalten könnte. In diesem Zusammenhang wurden drei Beobachtungen gemacht, die alle indirekt auf ein wesentlich komplexeres Reaktionsverhalten des Spleißprozesses, als in Gl. 20 dargestellt, hinweisen. So wurde erstens eine extrem langsame Geschwindigkeitskonstante für die Inteinfragment-Assoziation bestimmt ($k_{\text{on}} = 16,8$

$M^{-1}s^{-1}$), welche um mehrere Zehnerpotenzen langsamer verlief als alle bislang bekannten Proteinfragment-Assoziationen (siehe Kapitel 6.4). Diese extreme Langsamkeit könnte auf massive strukturelle Veränderungen des Inteins während der Komplexbildung hinweisen. Zweitens konnte für die gesamte Spleißreaktion eine ca. 20-fach kleinere Geschwindigkeitskonstante ermittelt werden ($k_{\text{Spleißen}} = 0,8 M^{-1}s^{-1}$) als für die Inteinfragment-Assoziation ($k_{\text{on}} = 16,8 M^{-1}s^{-1}$). Demzufolge entspricht die Komplexassoziation nicht dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion. Gleichzeitig konnte aber eine lineare Abhängigkeit der Spleißreaktion von der Reaktantenkonzentration detektiert werden, was ebenfalls darauf hindeutet, dass das Reaktionsschema wesentlich komplexer aufgebaut sein muss als es Gl. 20 impliziert. Die dritte interessante Beobachtung trat bei der Umsetzung der Peptidmutante Pep17 (Gly[-1]Ala) mit der Tripelmutante **7c** auf. Zwar konnte für diese beiden Reaktionspartner eine Assoziation der Inteinhälften in Lösung nachgewiesen werden (K_d -Wert = 2,3 μM), die native und die SDS-PAGE-Analyse des gleichen Reaktionsansatzes zeigten aber nur Spuren eines stabilen Komplexes (siehe Kapitel 5.2.4). Dieses Ergebnis könnte durch das Auftreten mindestens einer, vielleicht sogar mehrerer Komplex-Zwischenstufen erklärt werden, wobei der Nachweis der ersten Stufe bereits mittels Fluoreszenz-Anisotropie gelingt, während durch PAGE lediglich spätere und stabilere Zwischenstufen nachgewiesen werden können. Allerdings sind für ein besseres Verständnis der semisynthetischen Spleißreaktionen und für den Nachweis potentieller Komplex-Zwischenstufen bei der Inteinfragment-Assoziation weiterführende Studien notwendig.

Ebenfalls mit der kinetischen Charakterisierung einer Inteinfragment-Assoziation beschäftigt sich die 2005 veröffentlichte Arbeit von Shi und Muir [180]. Die Spleißreaktion des nativ gespaltenen *Ssp* DnaE-Inteins konnte mit Hilfe eines zweiten Cysteins in enger räumlicher Nähe zum katalytischen Cys[+1] durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke inhibiert werden, während die Assoziation unbeeinflusst blieb. Durch die Zugabe von reduzierenden Additiven konnte das Cys[+1] wieder kontrolliert freigesetzt und die Spleißreaktion gestartet werden. Die Einführung zweier Fluorophore (GFP und Texas Red) ermöglichte den Autoren die Bestimmung der kinetischen Parameter dieser Inteinfragment-Assoziation anhand von FRET-Messungen. Auf diesem Weg konnte eine Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung von $k_{\text{on}} = 2,8 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$, eine Dissoziationskonstante $K_d = 43 \text{ nM}$ und eine Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung für die Dissoziation des Inteinkomplexes mit $k_{\text{off}} = 1,2 s^{-1}$ ermittelt werden. Damit ist der K_d -Wert dieses nativ gespaltenen Inteins lediglich 23-fach kleiner als der Wert des künstlich gespaltenen Inteins dieser Arbeit. Interessanterweise ist die Geschwindigkeit der Assoziation

im *Ssp* DnaE-Intein aber ca. 10^6 mal schneller und nur die ebenfalls 10^5 mal schnellere Dissoziation des *Ssp* DnaE-Komplexes führt zu den relativ ähnlichen K_d -Werten von 1,1 μM und 43 nM.

Ein wichtiger Unterschied zwischen beiden Systemen konnte bei Untersuchungen zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Inteinhälften beobachtet werden. Während beim semisynthetischen *Ssp* DnaB-Intein eine Variation der Salzkonzentration im Spleißpuffer weder einen Einfluss auf die Spleißproduktbildung (Kapitel 5.1.3) noch auf die kinetischen Parameter der Komplexbildungsreaktion hatte (Kapitel 5.2.5), war die Assoziation der beiden rekombinanten *Ssp* DnaE-Fragmente vom Salzgehalt abhängig. Die wesentlich schnellere Assoziation des gespaltenen *Ssp* DnaE-Inteins profitiert somit von einem signifikanten Beitrag ionischer Wechselwirkungen, während beim *Ssp* DnaB-Intein wahrscheinlich nur hydrophobe Interaktionen an der Ausbildung des Komplexes beteiligt sind.

Weiterhin wurde in den kinetischen FRET-Analysen für das *Ssp* DnaE-Intein ein biphasisches Assoziationsverhalten beobachtet. Durch eine Angleichung der erhaltenen Fluoreszenzdaten mit einer biexponentiellen Funktion konnte daher neben der konzentrationsabhängigen Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{on}} = 2,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ eine zweite konzentrationsunabhängige Konstante erster Ordnung mit $k_{2\text{on}} = 0,65 \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden. In Analogie zu anderen Arbeiten mit rekonstituierenden Proteinfragmenten [181] interpretierten Shi und Muir die zweite langsame Reaktion als einen Reorganisationsschritt des gebildeten Komplexes. Anhand dieses Beispiels konnte somit die Ausbildung einer Komplexzwischenstufe charakterisiert werden, während mit dem semisynthetischen *Ssp* DnaB-Intein das Auftreten eines solchen Intermediats lediglich durch verschiedene Beobachtungen (siehe oben) postuliert werden konnte. Abschließend sei in diesem Zusammenhang erwähnt, dass bei Arbeiten von Jens Binschik mit einem $\text{Int}^{\text{N}}(1-12)$ -Peptid ohne N-Extein-Sequenz, welches im Vergleich zur Spleißreaktion eine 70-fach schnellere C-terminale Spaltung initiieren kann, ebenfalls ein biphasisches Verhalten beobachtet wurde [182]. Während der erste Assoziationsschritt dieses Peptids ($\text{Int}^{\text{N}}(1-12)\text{-KK(FI)A}$) mit Tripelmutante **7c** durch eine Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{on}} = 86,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ beschrieben wurde, lief der konzentrationsunabhängige zweite Schritt mit einer Konstante erster Ordnung $k_{2\text{on}} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ab. Dieses Ergebnis deutet stark auf das Auftreten mindestens einer Komplex-Zwischenstufe auch beim semisynthetischen *trans*-Proteinspleißen hin. Ein Grund dafür, dass dieser Effekt lediglich mit einem Peptid ohne N-Extein beobachtet wurde, könnte der in diesem Fall schnellere erste Assoziationsschritt sein. Aber auch die veränderte

Positionierung des Fluorophors (am C- oder N-Terminus) könnte einen Einfluss auf den veränderten Verlauf der Fluoreszenz-Anisotropie haben. Für ein besseres Verständnis und eine genaue Zuordnung dieser Effekte sind weitere Untersuchungen notwendig.

6.3 Identifikation neuer Nebenprodukte beim *trans*-Proteinspleißen

Durch die Verwendung punktmutierter Int^{N} - bzw. Int^{C} -Konstrukte konnte im Rahmen dieser Arbeit neben den bereits bekannten Spaltungsreaktionen an der N- bzw. C-terminalen Spleißstelle, die Bildung weiterer Nebenprodukte induziert werden. Die in diesen Fällen ausgelösten Zyklisierungsreaktionen geben interessante Details über den Spleißmechanismus preis, welche in dieser Form im Kontext der Inteine erstmals beobachtet wurden.

6.3.1 Thiazolinringbildung

In jeglicher Hinsicht ungewöhnliche und überraschende Ergebnisse lieferten Experimente mit dem Peptid Pep17 (Fl-KKESA- Int^{N}). Dieses Peptid enthielt eine Gly[-1]Ala-Substitution, also eine Mutation der ersten Aminosäure des N-Exteins, während die Int^{N} -Sequenz in nativer Form vorlag. Die Ausbeute an Spleißprodukt bei der Umsetzung mit dem spleißaktiven Fusionsprotein 7 (Int^{C} -Trx-His₆) betrug maximal ca. 10%, während die Komplexbildung mit der Doppelmutante 7b (Int^{C} (N154A)-Trx(S[+1]A)-His₆) praktisch vollständig ablief. Eine genauere Analyse des gebildeten Komplexes ergab, dass in diesem außergewöhnlichen Fall kein N→S-Acytransfer stattfand, sondern stattdessen die Ala[-1]-Cys1-Peptidbindung unter Wasserabspaltung in einen Thiazolinring umgelagert wurde (siehe Kapitel 5.3.1).

Bislang wurde in Veröffentlichungen zum Spleißmechanismus der Inteine ein Oxythiazolidinanion-Intermediat als Zwischenstufe beim N→S-Acytransfer lediglich postuliert [8-11, 45]. Ein direkter Nachweis gelang aufgrund der hohen Reaktivität und der Kurzlebigkeit dieser Spezies nicht. Durch die in dieser Arbeit beobachtete Folgereaktion des Oxythiazolidinanion-Intermediats zum Thiazolinring konnte ein stabiles Nebenprodukt dieses reaktiven Intermediats identifiziert und damit ein erster experimenteller Beleg für das Auftreten dieser Zwischenstufe geliefert werden (siehe Kapitel 5.3.1). Ausgelöst wurde die Zyklisierung zum Thiazolin offensichtlich durch den erhöhten sterischen Anspruch der Gly[-1]Ala-Substitution in Pep17 oder durch die nur mit einem Glycin zugänglichen Diederwinkel-Verzerrungen, welche bei der Ausbildung der aktiven Tasche an der N-terminalen Spleißstelle von Bedeutung sein könnten. Besonders interessant ist weiterhin, dass

stereospezifisch lediglich die (*S*)-Methylgruppe eines *L*-Alanins an Position [−1] den Effekt der Thiazolinringbildung auslöste, während mit einem Alanin in der *D*-Konfiguration sowohl eine verbesserte Spleißausbeute (ca. 30%) als auch eine erfolgreiche Katalyse des N→S-Acyltransfers im Komplex mit Mutante **7b** beobachtet wurde (siehe Kapitel 5.3.3). Ebenso aktiv waren auch weitere Peptide, in denen ein zusätzlicher Rückgrat-Methylenrest (Pep**20**, β-Alanin) bzw. eine N-Methylgruppe (Pep**21**, Sarcosin) in Form von unnatürlichen Aminosäurebausteinen an Position [−1] eingebracht waren. Eine Analyse des sterischen Anspruchs der N-terminalen Spleißstelle basierend auf der *Ssp* DnaB-Kristallstruktur ist in Abbildung 48 dargestellt. So liegt der Abstand des αC-Atoms von Gly[−1] 3,2 Å vom katalytisch essentiellen His73 entfernt (Abbildung 48A). Der Abstand von His73 zum Amidstickstoff der zu spaltenden Peptidbindung beträgt sogar lediglich 2,3 Å, so dass Ding *et al.* die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke und die Protonierung der Peptidbindung durch His73 postulierten [47].

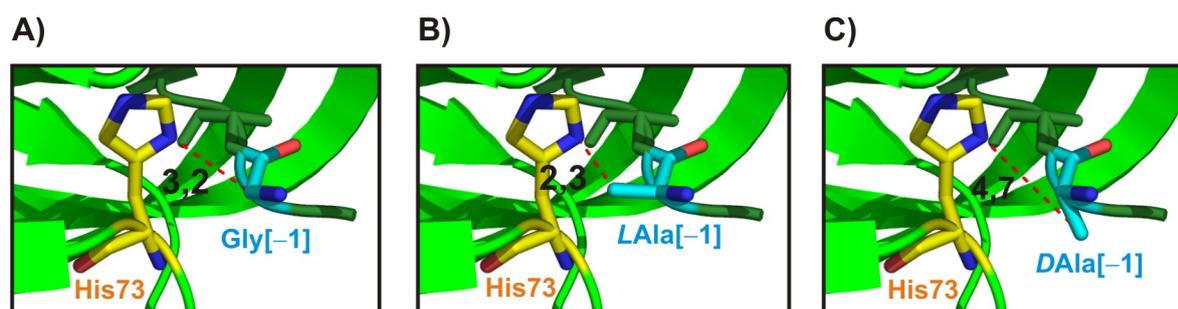


Abbildung 48. Sterischer und stereochemischer Anspruch der Position [−1] im *Ssp* DnaB-Intein. Darstellung der Kristallstruktur der N-terminalen Spleißstelle mit dem nativen Glycin an Position [−1] (A), einem substituierten *L*-Alanin (B) oder einem Alanin in der *D*-Konfiguration (C). Die Abstände zwischen His73 und dem αC-Atom (A) bzw. der zusätzlichen Methylgruppe (B und C) sind in Angström dargestellt. Diese Abbildung wurden mittels der PDB-Datei 1MI8 erstellt, Aminosäure-Substitutionen wurden ohne weitere Energieminimierung lediglich graphisch eingeführt.

Eine Substitution von Gly[−1] gegen *L*-Alanin verkleinert die Entfernung zwischen His73 und der exakt in die Richtung des Imidazolrings ausgerichteten Methylgruppe auf lediglich 2,3 Å (Abbildung 48B). Eine strukturelle Veränderung der aktiven Tasche ist somit in diesem Fall durchaus wahrscheinlich und bietet einen Erklärungsansatz für die beobachtete Thiazolinringbildung. Bei einem Einbau des stereoisomeren *D*-Alanins ist die Methylgruppe um ca. 109° gedreht, so dass hier eine sterische Störung der Seitenketten von His73 und *D*Ala[−1] kaum auftreten kann. Dementsprechend sollte die veränderte Stereochemie der Position [−1] wieder eine verbesserte Spleißausbeute mit sich bringen, was in diesem Fall auch auftrat (siehe Kapitel 5.3.3). Zusammenfassend begründen und untermauern die Daten

der *Ssp* DnaB-Kristallstruktur die beobachteten Aktivitätsprofile der jeweiligen Peptidvarianten. Allerdings soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass für die Lösung der Kristallstruktur die autokatalytische Aktivität des Inteins inhibiert werden musste, und daher Alanin-Substitutionen der ersten (Cys1Ala) und der letzten Aminosäure des Inteins (Asn154A) eingeführt wurden [47]. Auf Grund dieses Kompromisses muss die Validität der erhaltenen Strukturdaten gerade in der näheren Umgebung der Alanin-Mutationen kritisch betrachtet werden.

Fünfgliedrige Heterozyklisierung in der Natur

Die Bildung eines Thiazolinrings durch die Heterozyklisierung eines Cysteins wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht zum ersten Mal beobachtet und beschrieben. Die Natur nutzt die enzymatisch katalysierte Heterozyklisierung als zusätzliche Modifikationsform sowohl bei ribosomal als auch nicht-ribosomal generierten Peptidprodukten. Je nachdem ob es sich bei der zyklisierten und dehydrierten Aminosäure um Serin/Threonin oder um Cystein handelt, entsteht hierbei ein Oxazolin- bzw. Thiazolinring. Durch eine anschließende Oxidation werden auch die heteroaromatischen Oxazole bzw. Thiazole gebildet, genauso wie durch eine Reduktion die entsprechenden Oxazolidine bzw. Thiazolidine entstehen können. Die Heterozyklisierungen von Serinen, Threonin oder Cysteinen verändern nicht nur das Peptidrückgrat und die elektronischen Eigenschaften eines Peptids, sondern ermöglichen auch die Ausbildung neuer Erkennungs- und Interaktionsmerkmale mit Zielmolekülen wie DNA, RNA, Proteinen oder Metallionen.

Thiazol- und Oxazolfunktionen können in ribosomal generierten Proteinen in Form einer posttranslationalen Modifikation eingeführt werden. Ein Beispiel für ein solches Produkt ist das antimikrobielle Polypeptid Microcin B17 aus *E. coli* [183]. Sieben Gene (*mcbA-G*) sind an der Produktion dieses aus lediglich 43 Aminosäuren aufgebauten Proteins beteiligt, wobei die Enzyme McbB, C und D die posttranslationale Zyklisierung und anschließende Oxidation von 4 Serinen und 4 Cysteinen zu Oxazol- und Thiazolringen katalysieren (Abbildung 49A). Interessanterweise ist dieser Prozess aus Zyklisierung, Dehydratisierung und Dehydrierung auf eine externe Energiequelle angewiesen und beinhaltet die Spaltung von 5 ATP-Molekülen für die Bildung eines einzigen Thiazols oder Oxazols, während die Thiazolinringbildung mit dem semisynthetischen *Ssp* DnaB-Intein ohne die Zuführung von Energie ablaufen kann.

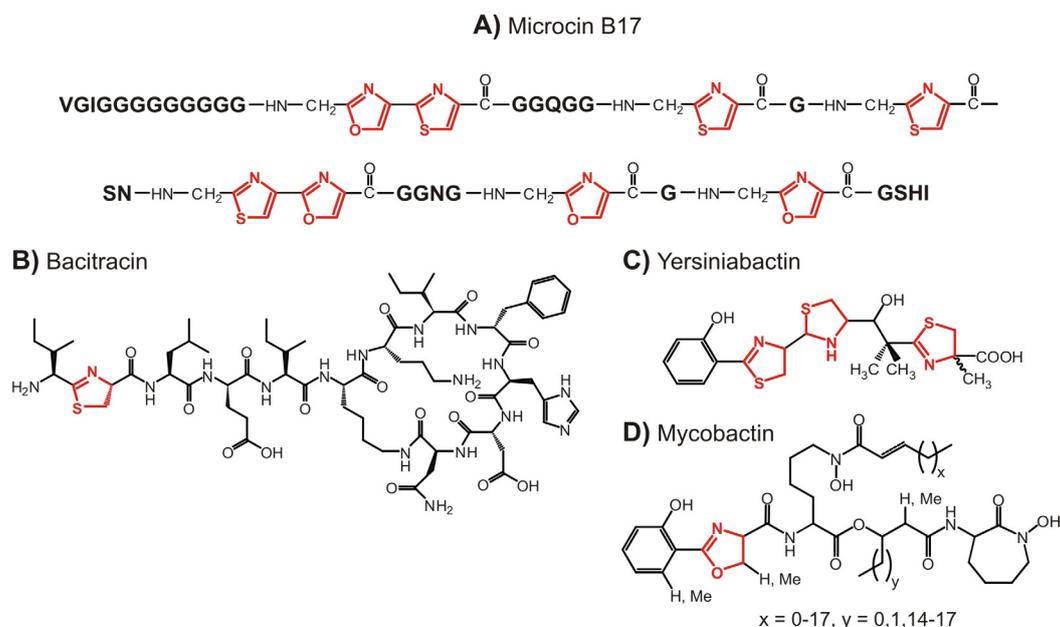


Abbildung 49. Heterozyklen in natürlichen Peptid- und Proteinprodukten. **A)** Bei der ribosomalen Biosynthese des Antibiotikums Microcin B17 erfolgt die Heterozyklisierung und Oxidation von 4 Cysteinen zu Thiazolen und 4 Serinen zu Oxazolen posttranslational. **B – D)** Nicht-ribosomal werden das Antibiotikum Bacitracin und die Siderophore Yersiniabactin und Mycobactin synthetisiert. Die Zyklisierung und Dehydratisierung von Cystein zum Thiazolin bzw. die anschließende Reduktion zum Thiazolidin erfolgen genauso wie die Heterozyklisierung von Serin zum Oxazolin „cotranslational“.

Einen anderen biosynthetischen Weg zum Einbau von Heterozyklen in Peptidstrukturen realisieren manche nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen. Bei diesen riesigen modular aufgebauten Multienzymkomplexen wird die wachsende und über eine Thioesterbindung kovalent am jeweiligen Peptidyl-Carrierprotein (PCP) gebundene Peptidkette wie an einem „Fließband“ prozessiert. Während bei der Biosynthese von Microcin B17 ein separates Enzym die Heterozyklisierung durch eine posttranslationale Modifikation einführt, katalysieren die nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen die Heterozyklisierungen von Cysteinen, Serinen oder Threoninen „cotranslational“, d.h. direkt beim Aufbau der Peptidkette [184]. Beispiele hierfür sind das Peptidantibiotikum Bacitracin aus *Bacillus subtilis* [185] oder die Siderophore Yersiniabactin aus *Yersinia pestis* [186] und Mycobactin aus *Mycobacterium tuberculosis* [187] (siehe Abbildung 49B bis 49D).

6.3.2 Lactonringbildung

Ein zweites zyklisches Nebenprodukt der Spleißreaktion wurde im Zusammenhang mit einer N-methylierten Aminosäure (Sarcosin) an Position [-1] identifiziert (Kapitel 5.3.4). Durch die in diesem Peptid (Pep21) eingeführte Gly[-1]Sar-Substitution kann neben der normalerweise fast ausschließlich vorliegenden *trans*-konfigurierten Peptidbindung auch eine signifikante

Umlagerung in die *cis*-Form stattfinden. Eine solche strukturelle Veränderung positioniert das β -C-Atom der Aminosäure an Position [-2] in enger räumlicher Nähe zu dem durch N \rightarrow S-Acyltransfer gebildeten Thioester. In Pep21 befindet sich an besagter Position [-2] ein Serinrest und damit eine Hydroxylgruppe in β -Stellung. Ausgelöst durch dieses Nukleophil wird eine Lactonzyklisierung initiiert, bei der durch eine nukleophile Substitutionsreaktion eine Caprolactonstruktur ausgebildet wird (siehe Abbildung 41). Inhibiert werden kann diese Reaktion durch die Deletion des essentiellen Nukleophils an Position [-2], was durch die Einführung einer Ser[-2]Ala-Substitution in Pep22 umgesetzt wurde.

Die Lactonzyklisierung kann natürlich in der hier dargestellten Form nicht als Nebenreaktion in einem natürlichen Inteinsystem auftreten, schließlich ist die verwendete N-methylierte Aminosäure Sarcosin nicht proteinogen. Allerdings gibt es mit Prolin auch eine natürliche vorkommende Aminosäure welche die Isomerie in die *cis*-Konfiguration begünstigt und damit eine ähnliche Zyklisierung auslösen könnte. Ein Vergleich der Sequenzposition [-1] aller in der Intein-Datenbank aufgelisteten Inteine zeigt, dass Pro[-1] durchaus in der Natur vorkommt. Die beiden nachgewiesenen spleißaktiven Inteine *Mth* RIR1 [188] und *Pfu* RIR1-2 [189] enthalten beide die Sequenz Thr[-3] Asn[-2] und Pro[-1] an der N-terminalen Spleißstelle und damit kein zur Zyklisierung geeignetes Nukleophil an Position [-2].

Interessant ist die beobachtete Zyklisierungsreaktion auch im Hinblick auf die *Expressed Protein Ligation* (EPL), deren Reaktionsmechanismus, genau wie beim semisynthetischen *trans*-Proteinspleißen, über die Ausbildung eines verbrückenden Thioesterintermediats verläuft (siehe Kapitel 2.2.3.2). In einer systematischen Studie zur Variabilität der N-terminalen Aminosäure an der Ligationsstelle wurde Prolin als ein stark reaktionsverlangsamender Rest identifiziert [176]. Als Ursache hierfür wurden sterische Abschirmungseffekte genannt, welche den nukleophilen Angriff des N-terminalen Cysteins stören. In diesem Zusammenhang bleibt die Frage offen, ob auch bei der EPL mit einem geeigneten Nukleophil an Position [-2] eine Lactonzyklisierung ähnlich der im semisynthetischen *Syp* DnaB-Intein induziert werden kann oder ob doch die katalytische Funktion des Inteins die treibende Kraft der Reaktion darstellt.

6.4 Die Proteinfragment-Komplementation

Wenn ein künstlich in zwei Fragmente gespaltenes Protein durch die Assoziation beider Hälften in Lösung wieder in seine native, wenn auch nicht kovalente Struktur zurückfaltet, spricht man von einer „Proteinfragment-Komplementation“ [160]. Demzufolge gehört auch

die in dieser Arbeit beschriebene Inteinfragment-Assoziation der Peptidsequenz Int^N(1-11) und des Proteinsegments Int^C(12-154) in diese Kategorie. Allerdings ist eine solche Reaktion ein nur selten auftretendes Phänomen, welches sowohl vom jeweiligen Protein als auch von der Spaltstelle abhängig ist, da in den meisten Fällen eine Spaltung lediglich zu aggregierenden und unlöslichen Fragmenten führt. Um die Besonderheit des semisynthetischen *Ssp* DnaB-Inteins nochmals zu verdeutlichen, soll in diesem vorletzten Kapitel der Diskussion ein Vergleich mit anderen komplementierenden Proteinen gezogen werden.

Prinzipiell kann zwischen zwei verschiedenen Arten der Komplementation unterschieden werden, je nachdem ob die Assoziation der beiden Komponenten spontan oder erst durch Einführung verschiedener Helferproteine abläuft. Letzterer Ansatz wird bei dem vor einigen Jahren etablierten Proteinfragment-Komplementations-Assay (PCA) genutzt, um verschiedene Protein/Protein-Interaktionen zu untersuchen. Voraussetzung hierbei ist die Fusionierung der gespaltenen Proteinfragmente (Reporterfragmente) mit jeweils einem Testprotein einer zu untersuchenden Protein/Protein-Wechselwirkung. Eine positive Bindung der Testproteine führt zu einer lokalen Konzentrationserhöhung der beiden Reporterfragmente, wodurch schließlich die Komplementation des funktionell aktiven Reporters ausgelöst und detektiert werden kann. Beispiele für solche gespaltene Reporterproteine sind Ubiquitin [190], Dihydrofolatreduktase [191], TEM1 β -Lactamase [192], Luciferase [193] oder das grün-fluoreszierende Protein (GFP) [194]. Auch das künstlich gespaltene *Sce* VMA-Intein, dessen Assoziation mittels verschiedener Dimerisierungsdomänen reguliert werden kann, gehört in diese Kategorie [57, 58, 61]. Ganz entscheidend für die Funktionalität dieser Ansätze ist eine möglichst geringe Restaffinität der Proteinfragmente, d.h. eine spontane Assoziation und Rekonstitution zum aktiven Protein darf nicht vorhanden sein.

Genau diese Fähigkeit ist es aber, die die zweite Art der Protein-Komplementation auszeichnet. Hier tritt die Assoziation beider Hälften spontan und ohne die Notwendigkeit weiterer Helferproteine, Kofaktoren oder Denaturierungs- und Renaturierungsschritte auf. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang Komplementationen zwischen einer kurzen Peptidsequenz und einem größeren Proteinfragment, da auf diese Weise ein Teil eines aktiven Proteins vollsynthetisch zugänglich gemacht werden kann. Neben dem *Ssp* DnaB-Intein dieser Arbeit und den bereits in Kapitel 6.1.1 vorgestellten weiteren semisynthetischen Inteinen konnte ein solcher Effekt bislang nur für wenige andere gespaltene Proteine gezeigt werden. Hierzu gehört das grün-fluoreszierende Protein (GFP), welches in ein 214 AS

umfassendes N-terminales Proteinfragment und ein lediglich 16 AS großes C-terminales Peptidsegment gespalten werden kann [195]. Erst die Mischung beider Komponenten führt zur Ausbildung der typischen grünen Fluoreszenz. Auch die β -Galaktosidase kann durch die Deletion einer kurzen N-terminalen Sequenz zunächst inaktiviert, und durch die externe Zugabe einer entsprechenden Peptidsequenz wieder regeneriert werden [168]. Dieser auch als α -Komplementation bezeichnete Prozess stellt zusammen mit der selektiven Hydrolyse von X-Gal ein wichtiges biochemisches Selektionssystem dar. Ein anderes Beispiel einer spontanen Proteinfragment-Komplementation liefert die Ribonuklease S, welche durch den partiellen Verdau mit der Protease Subtilisin aus der Ribonuklease A hervorgeht [196]. Das hierbei entstehende 20 AS große N-terminale Fragment (S-Peptid) assoziiert in Lösung spontan mit dem C-terminalen Proteinsegment (S-Protein) zur enzymatisch aktiven Ribonuklease S. Untersuchungen zur Affinität beider Fragmente, basierend auf der zeitlichen Veränderung der Fluoreszenz-Anisotropie [197], wurden in ähnlicher Weise betrieben wie die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zum semisynthetischen *Ssp* DnaB-Intein. Während das Fluorophor Carboxyfluorescein im Rahmen dieser Arbeit am N-Terminus des synthetisch generierten Int^N-Fragments eingeführt wurde, nutzten Park *et al.* die rekombinant generierte Fusion aus GFP und dem S-Peptid. Die erhaltenen Dissoziationskonstanten von $K_d = 42$ nM für Ribonuklease S und $K_d = 1,1$ μ M für das an Position 11 gespaltene *Ssp* DnaB-Intein unterschieden sich um das ca. 25-fache. Ebenfalls in Lösung spontan rekonstituieren kann die in an Position 22 gespaltene Barnase, ein 110 AS großes Protein mit Ribonuklease-Aktivität aus *Bacillus amyloliquefaciens* [181]. Die rekonstituierte Barnase, erhalten aus dem synthetischen Fragment 1-22 und dem Bromcyan-gespaltenen Fragment 23-110, zeigte zwar einen dem nativen Protein sehr ähnlichen strukturellen Aufbau (Analyse mittels CD-Spektroskopie und Tryptophan-Fluoreszenz), die enzymatische Aktivität betrug allerdings lediglich 10%. Während das Tryptophan-freie Peptid 1-22 bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 280$ nm lediglich eine sehr schwache Fluoreszenzintensität aufwies, zeigte das Fragment 23-110 ein Emmissionsmaximum bei $\lambda_{\max} = 349$ nm. Die Zugabe des Peptids 1-22 und die Rekonstitution des vollständigen Proteins führten zu einer Verschiebung dieses Maximums ($\lambda_{\max} = 336$ nm). Durch die Messung der zeitlichen Abhängigkeit dieser Tryptophan-Fluoreszenz gelang Kippen *et al.* die quantitative Analyse der Barnase-Komplementation. Die erhaltene Dissoziationskonstante $K_d = 3,1 \pm 0,1$ μ M unterscheidet sich kaum von der des semisynthetischen *Ssp* DnaB-Inteins dieser Arbeit (1,1 μ M). Die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation $k_{\text{on}} = 0,8 \times 10^5$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und die der Dissoziation $k_{\text{off}} = 0,24$ s^{-1} sind allerdings im Barnase-System um 4 Zehnerpotenzen größer. Demzufolge

erfolgt die Art der Interaktion und der Prozess der Proteinfaltung zwischen diesen beiden künstlich gespaltenen Proteinen wahrscheinlich trotz des ähnlichen K_d -Werts sehr unterschiedlich.

Abschließend sei bei dem in diesem Kapitel gezogenen Vergleich komplementierender Proteine nochmals betont, dass das an Position 11 gespaltene *Ssp* DnaB-Intein das bislang kleinste beschriebene Peptidfragment repräsentiert, welches zur spontanen Komplementation mit seinem rekombinanten Gegenstück befähigt ist. Die Geschwindigkeit mit der dieser Prozess abläuft ist zwar deutlich langsamer als die Assoziation anderer genannter Beispiele, allerdings stellt die 70%-ige Rekonstitution der Spleißaktivität des *Ssp* DnaB-Inteins einen überraschend guten Wert dar. Besonders interessant ist der Vergleich dieser Ausbeute mit dem an Position 104 gespaltenen und rein rekombinant generierten *Ssp* DnaB-Intein, da in letzterem Fall lediglich ca. 40% Spleißproduktbildung detektiert wurden [55]. Das in diesem Zusammenhang postulierte Auftreten einer fehlgefalteten Population an $\text{Int}^{\text{N}}(1-104)$ oder $\text{Int}^{\text{C}}(105-154)$ tritt anscheinend beim an Position 11 gespaltenen Intein in deutlich kleinerem Umfang auf. Diese Beobachtung könnte auf eine ausgeprägtere Vorfaltung des $\text{Int}^{\text{C}}(12-154)$ -Fragments hindeuten, allerdings sind in diesem Zusammenhang weiterführende strukturelle Untersuchungen, z.B. mittels NMR-Spektroskopie oder durch CD-Messungen (zirkulärer Dichroismus) erforderlich.

6.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine neue generelle Methode zur N-terminalen Modifikation von verschiedenen Zielproteinen etabliert. Das Kernstück dieser Technik ist ein künstlich an Position 11 gespaltenes *Ssp* DnaB-Intein, welches im Rahmen dieser Arbeit erstmals in einem semisynthetischen Kontext angewendet wurde. Auf diese Weise konnten Zielproteine wie Thioredoxin und β -Lactamase erfolgreich mit einem 5,6-Carboxyfluorescein-Molekül modifiziert werden. Allerdings dienten diese Proteine in erster Linie als Modellsysteme zur Etablierung und Evaluierung der Anwendbarkeitsbreite der Methode.

Ein erster wichtiger Ausblick ist daher die Anwendung der Methode im Kontext biologisch interessanter Zielproteine zur Beantwortung einer biologischen oder biochemischen Fragestellung. Ein erster Schritt in diese Richtung wurde durch die N-terminale Modifikation eines ca. 70 kDa großen Didomänenproteins der nicht-ribosomalen Peptidsynthetase GrsA aus *Bacillus brevis* unternommen (GrsA A-PCP, unpublizierte Daten von Joachim Zettler). Durch eine Kombination mit anderen selektiven

Modifikationenreaktion, z.B. Biokonjugation über einen einzelnen Cysteinrest oder eine chemoenzymatische Modifikation der PCP-Domäne mit einer Phosphopantetheinyltransferase (siehe Kapitel 2.2.2), könnten zwei Fluorophore an unterschiedlichen Positionen im Zielprotein eingeführt werden. Dies wiederum ist die Voraussetzung zur Detektion eines Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET), welcher schließlich neue Informationen zu den dynamischen Prozessen innerhalb eines Moduls einer nicht-ribosomalen Peptidsynthetase liefern könnte.

Da sich die neue semisynthetische Methode nicht nur durch ihre generelle Anwendbarkeit auf verschiedene Zielproteine auszeichnet, sondern auch die Möglichkeit der N-terminalen Markierung mit unterschiedlichen chemischen Modifikationen bietet, sollte auch diese Anwendungsbreite in zukünftigen Arbeit untersucht werden. Erste Ansätze in dieser Richtung wurden durch Modifikationen mit Biotin (unpublizierte Daten Daniel Garbe) oder mit einer kleinen Polyethylenglycol-Einheit (PEG1) unternommen (unpublizierte Daten Alexandra Wasmuth). Die Einbringung einer großen PEG-Domäne wäre eine sehr interessante chemische Modifikation zur Verbesserung der Löslichkeit und der pharmakologischen Eigenschaften des Zielproteins. Allerdings waren erste Vorversuche mit PEG4000 aus bislang nicht verstandenen Gründen erfolglos (unpublizierte Daten). Auch die N-terminale Modifikation mit Glycosyl-, Phosphor- oder Aminoxygruppen wäre ein sehr interessantes Ziel, weil Peptide mit diesen Funktionen unter den Bedingungen einer Boc-basierten Festphasenpeptidsynthese (SPPS) nicht synthetisiert werden können. Allerdings wird die für NCL und EPL essentielle C-terminale Thioestergruppe bevorzugt mit Hilfe der Boc-SPPS eingeführt, so dass die Darstellung semisynthetischer Proteine mit Glycosyl-, Phosphor- oder Aminoxygruppen mittels NCL oder EPL schwierig ist. Im Gegensatz hierzu ist die Synthese des Int^N-Fragments mit der Fmoc-basierten SPPS einfach umsetzbar, und diese Art der Festphasensynthese sollte mit den eben genannten chemischen Modifikationen problemlos kombinierbar sein.

Das semisynthetische Proteinspleißen gehört neben nur wenigen anderen Techniken in die Kategorie der „Rückgrat Protein-Semisynthese“ (siehe Kapitel 2.2.3), da hier ein synthetisches Peptid und ein ribosomal generiertes Protein über eine native Peptidbindung kovalent verknüpft werden. Eine biochemisch besonders interessante Untergruppe ist die „rekonstituierende Proteinsemisynthese“, bei der durch die Ligation eines synthetischen Peptidfragments und eines rekombinanten Proteinfragments nahezu „spurlos“ eine komplette Proteinstruktur wieder rekonstituiert wird. Mit Hilfe einer solchen Technik können z.B. posttranslationale Modifikationen in ein Zielprotein eingebracht oder segmentell

isotopenmarkierte Proteine generiert werden. Erste Schritte zur rekonstituierenden Proteinsemisynthese sind mit dem *Ssp* DnaB-Intein dieser Arbeit bislang leider fehlgeschlagen (siehe Kapitel 5.1.6). Dies könnte u. a. auf die extrem langsame Assoziation der beiden Inteinfragmente zurückzuführen sein, welche etwa 10^5 Mal langsamer als z.B. beim nativ gespaltenen *Ssp* DnaE-Intein abläuft. Eine Verbesserung dieser Assoziationsgeschwindigkeit könnte somit auch eine Verbesserung der katalytischen Eigenschaften des Inteins mit sich bringen. Experimentell umgesetzt werden könnte ein solches Ziel zum Einen durch gerichtete Proteinevolution, zum Anderen durch die gezielte Einführung wechselwirkender Gruppen. Ein Beispiel für den letztgenannten Ansatz wurde bereits von Ando *et al.* durch das Ligand/Rezeptor-Paar Trimethoprim/Dihydrofolatreduktase etabliert [170]. Ebenfalls eine Erhöhung der Affinität der Inteinfragmente könnte durch die gezielte Einführung ionischer Wechselwirkungspartnern erreicht werden, wobei die geladenen Aminosäureseitenketten von Lysin bzw. Arginin und Glutamat bzw. Aspartat genutzt werden könnten.

Ebenfalls ein wichtiger Vorteil der Methode basiert auf der spezifischen Interaktion der Inteinfragmente, was eine selektive Modifikation der Zielproteine auch in sehr komplexen Umgebungen ermöglicht. So wurde bereits in ersten Vorversuchen eine Protein-Semisynthese im *E. coli*-Zellextrakt erfolgreich durchgeführt (siehe Kapitel 5.1.8). Nagamune und Mitarbeiter nutzten das Intein zur Modifikation von Proteinen auf Zelloberflächen [170]. Die selektive N-terminale Modifikation innerhalb einer lebenden Zelle ist folglich der nächste umzusetzende Schritt. Während das Fusionskonstrukt aus Int^C und Zielprotein durch transiente Transfektion relativ einfach innerhalb einer Zelle generiert werden kann, muss das synthetische Peptid auf andere Weise eingeführt werden. Dies könnte z.B. mittels einer Mikroinjektion erfolgen, was eine besonders hohe Peptidkonzentration in der Zelle ermöglichen würde. Gerade im Hinblick auf die langsame Assoziationsgeschwindigkeit der Inteinfragmente und den moderaten K_d -Wert ($K_d = 1,1 \mu\text{M}$) ist dieser Ansatz besonders vielversprechend. Eine alternative Möglichkeit bieten die sogenannten Proteintransduktionsdomänen (PTD), welche den Transport durch die Zellmembran initiieren. Solch kurze und stark positiv geladene PTD-Peptidsequenzen könnten entweder über eine Peptidbindung am C-Terminus der Int^N-Sequenz oder über eine Disulfidbrücke am katalytischen Cys1 [73] kovalent gebunden werden.

Die Nutzung des semisynthetischen Inteins zur detaillierten Untersuchung des Spleißmechanismus wurde zwar in dieser Arbeit z.B. durch einen Alanin-Scan, durch die Einführung unnatürlicher Aminosäurebausteine oder durch die Identifikation zweier

zyklischer Nebenprodukte intensiv betrieben, das Potential dieses Systems ist allerdings noch lange nicht ausgereizt. So könnten z.B. NMR-Messungen oder röntgenkristallographische Daten des C-terminalen Inteinfragments (Int^{C}) vor und nach Zugabe des Int^{N} -Gegenstücks neue Erkenntnisse zur Inteinfragment-Assoziation und zur Ausbildung der aktiven Taschen an N- und C-terminaler Spleißstelle liefern. Außerdem könnten aufgrund des semisynthetischen Zugangs verschiedene NMR-aktiven Isotope oder Marker innerhalb der Int^{N} -Sequenz eingebaut werden, um noch detailliertere Strukturinformationen zu erhalten. Auch die Verwendung von (Thio)Ester- oder seitenkettenverzweigten Peptiden, welche Strukturanaloga zum gebildeten Thioester des $\text{N} \rightarrow \text{S}$ -Acyltransfers darstellen, könnte mit diesem System umgesetzt, und somit die räumliche und elektronische Organisation des katalytischen Zentrums untersucht werden. Abschließend sei betont, dass erst durch ein fundiertes mechanistisches Verständnis der semisynthetischen Spleißreaktion die Grundlage geschaffen wird das System zu optimieren und alle Vorteile bestmöglich auszunutzen.

7 Literatur

1. Hermanson, G. T., *Bioconjugate techniques*. Academic Press: San Diego, 1996; p 785.
2. Wang, L.; Schultz, P. G., Expanding the genetic code. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2004**, 44, 34-66.
3. Dawson, P. E.; Kent, S. B., Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu Rev Biochem*, **2000**, 69, 923-60.
4. Durek, T.; Becker, C. F., Protein semi-synthesis: new proteins for functional and structural studies. *Biomol Eng*, **2005**, 22, 153-72.
5. Muir, T. W., Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation. *Annu Rev Biochem*, **2003**, 72, 249-89.
6. Hirata, R.; Ohsumk, Y.; Nakano, A.; Kawasaki, H.; Suzuki, K.; Anraku, Y., Molecular structure of a gene, VMA1, encoding the catalytic subunit of H(+)-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **1990**, 265, 6726-33.
7. Kane, P. M.; Yamashiro, C. T.; Wolczyk, D. F.; Neff, N.; Goebel, M.; Stevens, T. H., Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase. *Science*, **1990**, 250, 651-7.
8. Evans, T. C., Jr.; Xu, M. Q., Mechanistic and kinetic considerations of protein splicing. *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 4869-4883.
9. Noren, C. J.; Wang, J.; Perler, F. B., Dissecting the Chemistry of Protein Splicing and Its Applications. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2000**, 39, 450-466.
10. Paulus, H., Protein splicing and related forms of protein autoprocesing. *Annu Rev Biochem*, **2000**, 69, 447-96.
11. Xu, M. Q.; Perler, F. B., The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation. *Embo J*, **1996**, 15, 5146-53.
12. Giriati, I.; Muir, T. W.; Perler, F. B., Protein splicing and its applications. *Genet Eng (N Y)*, **2001**, 23, 171-99.
13. Muralidharan, V.; Muir, T. W., Protein ligation: an enabling technology for the biophysical analysis of proteins. *Nat Methods*, **2006**, 3, 429-38.
14. Perler, F. B., Protein splicing of inteins and hedgehog autoproteolysis: structure, function, and evolution. *Cell*, **1998**, 92, 1-4.
15. Perler, F. B.; Davis, E. O.; Dean, G. E.; Gimble, F. S.; Jack, W. E.; Neff, N.; Noren, C. J.; Thorner, J.; Belfort, M., Protein splicing elements: inteins and exteins--a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucleic Acids Res*, **1994**, 22, 1125-7.
16. Chong, S.; Xu, M. Q., Protein splicing of the *Saccharomyces cerevisiae* VMA intein without the endonuclease motifs. *J Biol Chem*, **1997**, 272, 15587-90.
17. Derbyshire, V.; Wood, D. W.; Wu, W.; Dansereau, J. T.; Dalgaard, J. Z.; Belfort, M., Genetic definition of a protein-splicing domain: functional mini-inteins support structure predictions and a model for intein evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1997**, 94, 11466-71.
18. Wu, H.; Xu, M. Q.; Liu, X. Q., Protein trans-splicing and functional mini-inteins of a cyanobacterial dnaB intein. *Biochim Biophys Acta*, **1998**, 1387, 422-32.
19. Shingledecker, K.; Jiang, S. Q.; Paulus, H., Molecular dissection of the *Mycobacterium tuberculosis* RecA intein: design of a minimal intein and of a trans-splicing system involving two intein fragments. *Gene*, **1998**, 207, 187-95.
20. Gimble, F. S.; Thorner, J., Homing of a DNA endonuclease gene by meiotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **1992**, 357, 301-6.
21. Liu, X. Q.; Hu, Z., A DnaB intein in *Rhodothermus marinus*: indication of recent intein homing across remotely related organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1997**, 94, 7851-6.
22. Perler, F. B.; Olsen, G. J.; Adam, E., Compilation and analysis of intein sequences. *Nucleic Acids Res*, **1997**, 25, 1087-93.
23. Pietrokovski, S., Conserved sequence features of inteins (protein introns) and their use in identifying new inteins and related proteins. *Protein Sci*, **1994**, 3, 2340-50.
24. Pietrokovski, S., Modular organization of inteins and C-terminal autocatalytic domains. *Protein Sci*, **1998**, 7, 64-71.
25. Evans, T. C., Jr.; Benner, J.; Xu, M. Q., Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element. *Protein Sci*, **1998**, 7, 2256-64.
26. Mathys, S.; Evans, T. C.; Chute, I. C.; Wu, H.; Chong, S.; Benner, J.; Liu, X. Q.; Xu, M. Q., Characterization of a self-splicing mini-intein and its conversion into autocatalytic N- and C-terminal cleavage elements: facile production of protein building blocks for protein ligation. *Gene*, **1999**, 231, 1-13.

27. Southworth, M. W.; Amaya, K.; Evans, T. C.; Xu, M. Q.; Perler, F. B., Purification of proteins fused to either the amino or carboxy terminus of the Mycobacterium xenopi gyrase A intein. *Biotechniques*, **1999**, 27, 110-4, 116, 118-20.
28. Chong, S.; Montello, G. E.; Zhang, A.; Cantor, E. J.; Liao, W.; Xu, M. Q.; Benner, J., Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. *Nucleic Acids Res*, **1998**, 26, 5109-15.
29. Ge, X.; Yang, D. S.; Trabbic-Carlson, K.; Kim, B.; Chilkoti, A.; Filipe, C. D., Self-cleavable stimulus responsive tags for protein purification without chromatography. *J Am Chem Soc*, **2005**, 127, 11228-9.
30. Camarero, J. A.; Muir, T. W., Biosynthesis of a Head-to-Tail Cyclized Protein with Improved Biological Activity. *J Am Chem Soc*, **1999**, 121, 5597-5598.
31. Evans, T. C., Jr.; Benner, J.; Xu, M. Q., The cyclization and polymerization of bacterially expressed proteins using modified self-splicing inteins. *J Biol Chem*, **1999**, 274, 18359-63.
32. Scott, C. P.; Abel-Santos, E.; Wall, M.; Wahnon, D. C.; Benkovic, S. J., Production of cyclic peptides and proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1999**, 96, 13638-43.
33. Xu, R.; Ayers, B.; Cowburn, D.; Muir, T. W., Chemical ligation of folded recombinant proteins: segmental isotopic labeling of domains for NMR studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1999**, 96, 388-93.
34. Yamazaki, T., Segmental Isotope Labeling for Protein NMR Using Peptide Splicing. *J Am Chem Soc*, **1998**, 120, 5591-5592.
35. Zuger, S.; Iwai, H., Intein-based biosynthetic incorporation of unlabeled protein tags into isotopically labeled proteins for NMR studies. *Nat Biotechnol*, **2005**, 23, 736-40.
36. Kwon, Y.; Coleman, M. A.; Camarero, J. A., Selective immobilization of proteins onto solid supports through split-intein-mediated protein trans-splicing. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2006**, 45, 1726-9.
37. Chong, S.; Shao, Y.; Paulus, H.; Benner, J.; Perler, F. B.; Xu, M. Q., Protein splicing involving the *Saccharomyces cerevisiae* VMA intein. The steps in the splicing pathway, side reactions leading to protein cleavage, and establishment of an in vitro splicing system. *J Biol Chem*, **1996**, 271, 22159-68.
38. Chong, S.; Williams, K. S.; Wotkowicz, C.; Xu, M. Q., Modulation of protein splicing of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane ATPase intein. *J Biol Chem*, **1998**, 273, 10567-77.
39. Telenti, A.; Southworth, M.; Alcaide, F.; Daugelat, S.; Jacobs, W. R., Jr.; Perler, F. B., The Mycobacterium xenopi GyrA protein splicing element: characterization of a minimal intein. *J Bacteriol*, **1997**, 179, 6378-82.
40. Southworth, M. W.; Benner, J.; Perler, F. B., An alternative protein splicing mechanism for inteins lacking an N-terminal nucleophile. *Embo J*, **2000**, 19, 5019-26.
41. Iwai, K.; Ando, T., N-O Acyl Rearrangement. *Methods Enzymol*, **1967**, 11, 262-82.
42. Duan, X.; Gimble, F. S.; Quijcho, F. A., Crystal structure of PI-SceI, a homing endonuclease with protein splicing activity. *Cell*, **1997**, 89, 555-64.
43. Ichihyanagi, K.; Ishino, Y.; Ariyoshi, M.; Komori, K.; Morikawa, K., Crystal structure of an archaeal intein-encoded homing endonuclease PI-PfuI. *J Mol Biol*, **2000**, 300, 889-901.
44. Klabunde, T.; Sharma, S.; Telenti, A.; Jacobs, W. R., Jr.; Sacchettini, J. C., Crystal structure of GyrA intein from Mycobacterium xenopi reveals structural basis of protein splicing. *Nat Struct Biol*, **1998**, 5, 31-6.
45. Mizutani, R.; Nogami, S.; Kawasaki, M.; Ohya, Y.; Anraku, Y.; Satow, Y., Protein-splicing reaction via a thiazolidine intermediate: crystal structure of the VMA1-derived endonuclease bearing the N and C-terminal propeptides. *J Mol Biol*, **2002**, 316, 919-29.
46. Sun, P.; Ye, S.; Ferrandon, S.; Evans, T. C.; Xu, M. Q.; Rao, Z., Crystal structures of an intein from the split dnaE gene of *Synechocystis* sp. PCC6803 reveal the catalytic model without the penultimate histidine and the mechanism of zinc ion inhibition of protein splicing. *J Mol Biol*, **2005**, 353, 1093-105.
47. Ding, Y.; Xu, M. Q.; Ghosh, I.; Chen, X.; Ferrandon, S.; Lesage, G.; Rao, Z., Crystal structure of a mini-intein reveals a conserved catalytic module involved in side chain cyclization of asparagine during protein splicing. *J Biol Chem*, **2003**, 278, 39133-42.
48. Romanelli, A.; Shekhtman, A.; Cowburn, D.; Muir, T. W., Semisynthesis of a segmental isotopically labeled protein splicing precursor: NMR evidence for an unusual peptide bond at the N-extein-intein junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2004**, 101, 6397-402.
49. Shingledecker, K.; Jiang, S.; Paulus, H., Reactivity of the cysteine residues in the protein splicing active center of the Mycobacterium tuberculosis RecA intein. *Arch Biochem Biophys*, **2000**, 375, 138-44.
50. Shao, Y.; Xu, M. Q.; Paulus, H., Protein splicing: characterization of the aminosuccinimide residue at the carboxyl terminus of the excised intervening sequence. *Biochemistry*, **1995**, 34, 10844-50.
51. Brennan, T. V.; Clarke, S., Effect of adjacent histidine and cysteine residues on the spontaneous degradation of asparaginyl- and aspartyl-containing peptides. *Int J Pept Protein Res*, **1995**, 45, 547-53.
52. Shao, Y.; Paulus, H., Protein splicing: estimation of the rate of O-N and S-N acyl rearrangements, the last step of the splicing process. *J Pept Res*, **1997**, 50, 193-8.
53. Mills, K. V.; Lew, B. M.; Jiang, S.; Paulus, H., Protein splicing in trans by purified N- and C-terminal fragments of the Mycobacterium tuberculosis RecA intein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, 95, 3543-8.

54. Southworth, M. W.; Adam, E.; Panne, D.; Byer, R.; Kautz, R.; Perler, F. B., Control of protein splicing by intein fragment reassembly. *Embo J*, **1998**, 17, 918-26.
55. Brenzel, S.; Kurpiers, T.; Mootz, H. D., Engineering artificially split inteins for applications in protein chemistry: biochemical characterization of the split Ssp DnaB intein and comparison to the split Sce VMA intein. *Biochemistry*, **2006**, 45, 1571-8.
56. Kurpiers, T.; Mootz, H. D., Site-Specific Chemical Modification of Proteins with a Prelabelled Cysteine Tag Using the Artificially Split Mxe GyrA Intein. *Chembiochem*, **2008**, 9, 2317-2325.
57. Mootz, H. D.; Muir, T. W., Protein splicing triggered by a small molecule. *J Am Chem Soc*, **2002**, 124, 9044-5.
58. Brenzel, S.; Mootz, H. D., Design of an intein that can be inhibited with a small molecule ligand. *J Am Chem Soc*, **2005**, 127, 4176-7.
59. Tyszkiewicz, A. B.; Muir, T. W., Activation of protein splicing with light in yeast. *Nat Methods*, **2008**, 5, 303-5.
60. Buskirk, A. R.; Ong, Y. C.; Gartner, Z. J.; Liu, D. R., Directed evolution of ligand dependence: small-molecule-activated protein splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2004**, 101, 10505-10.
61. Skretas, G.; Wood, D. W., Regulation of protein activity with small-molecule-controlled inteins. *Protein Sci*, **2005**, 14, 523-32.
62. Wu, H.; Hu, Z.; Liu, X. Q., Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, 95, 9226-31.
63. Caspi, J.; Amitai, G.; Belenkiy, O.; Pietrokovski, S., Distribution of split DnaE inteins in cyanobacteria. *Mol Microbiol*, **2003**, 50, 1569-77.
64. Iwai, H.; Zuger, S.; Jin, J.; Tam, P. H., Highly efficient protein trans-splicing by a naturally split DnaE intein from *Nostoc punctiforme*. *FEBS Lett*, **2006**, 580, 1853-8.
65. Hall, T. M.; Porter, J. A.; Young, K. E.; Koonin, E. V.; Beachy, P. A.; Leahy, D. J., Crystal structure of a Hedgehog autoprocessing domain: homology between Hedgehog and self-splicing proteins. *Cell*, **1997**, 91, 85-97.
66. Poland, B. W.; Xu, M. Q.; Quioco, F. A., Structural insights into the protein splicing mechanism of PI-SceI. *J Biol Chem*, **2000**, 275, 16408-13.
67. Sun, W.; Yang, J.; Liu, X. Q., Synthetic Two-piece and Three-piece Split Inteins for Protein trans-splicing. *J Biological Chemistry*, **2004**, 279, 35281-35286.
68. Kent, S. B., Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem*, **1988**, 57, 957-89.
69. Johnsson, N.; Johnsson, K., A fusion of disciplines: chemical approaches to exploit fusion proteins for functional genomics. *Chembiochem*, **2003**, 4, 803-10.
70. Hahn, M. E.; Muir, T. W., Manipulating proteins with chemistry: a cross-section of chemical biology. *Trends Biochem Sci*, **2005**, 30, 26-34.
71. Nilsson, B. L.; Soellner, M. B.; Raines, R. T., Chemical synthesis of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **2005**, 34, 91-118.
72. Pellois, J. P.; Muir, T. W., Semisynthetic proteins in mechanistic studies: using chemistry to go where nature can't. *Curr Opin Chem Biol*, **2006**, 10, 487-91.
73. Giriat, I.; Muir, T. W., Protein semi-synthesis in living cells. *J Am Chem Soc*, **2003**, 125, 7180-1.
74. Valiyaveetil, F. I.; Sekedat, M.; Mackinnon, R.; Muir, T. W., Glycine as a D-amino acid surrogate in the K(+)-selectivity filter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2004**, 101, 17045-9.
75. Richards, F. M.; Vithayathil, P. J., The preparation of subtilisin-modified ribonuclease and the separation of the peptide and protein components. *J Biol Chem*, **1959**, 234, 1459-65.
76. Chaiken, I. M.; Freedman, M. H.; Lyster, J. R., Jr.; Cohen, J. S., Preparation and studies of ¹⁹F-labeled and enriched ¹³C-labeled semisynthetic ribonuclease-S' analogues. *J Biol Chem*, **1973**, 248, 884-91.
77. Makino, T.; Matsumoto, M.; Suzuki, Y.; Kitajima, Y.; Yamamoto, K.; Kuramoto, M.; Minamitake, Y.; Kangawa, K.; Yabuta, M., Semisynthesis of human ghrelin: condensation of a Boc-protected recombinant peptide with a synthetic O-acylated fragment. *Biopolymers*, **2005**, 79, 238-47.
78. Davey, M. W.; Rommelaere, H.; de Boeck, S.; Goethals, M.; van Damme, J.; Vandekerckhove, J., Trypsin-mediated semisynthesis of salmon calcitonin. *Int J Pept Protein Res*, **1995**, 45, 380-5.
79. Kiick, K. L.; Saxon, E.; Tirrell, D. A.; Bertozzi, C. R., Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2002**, 99, 19-24.
80. Kirshenbaum, K.; Carrico, I. S.; Tirrell, D. A., Biosynthesis of proteins incorporating a versatile set of phenylalanine analogues. *Chembiochem*, **2002**, 3, 235-7.
81. Link, A. J.; Vink, M. K.; Tirrell, D. A., Synthesis of the functionalizable methionine surrogate azidohomoalanine using Boc-homoserine as precursor. *Nat Protoc*, **2007**, 2, 1884-7.
82. Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G., A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science*, **1989**, 244, 182-8.
83. Wang, L.; Brock, A.; Herberich, B.; Schultz, P. G., Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science*, **2001**, 292, 498-500.

84. Chin, J. W.; Cropp, T. A.; Anderson, J. C.; Mukherji, M.; Zhang, Z.; Schultz, P. G., An expanded eukaryotic genetic code. *Science*, **2003**, 301, 964-7.
85. Xie, J.; Schultz, P. G., A chemical toolkit for proteins--an expanded genetic code. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2006**, 7, 775-82.
86. Wang, K.; Neumann, H.; Peak-Chew, S. Y.; Chin, J. W., Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. *Nat Biotechnol*, **2007**, 25, 770-7.
87. Geoghegan, K. F.; Stroh, J. G., Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjug Chem*, **1992**, 3, 138-46.
88. Joshi, N. S.; Whitaker, L. R.; Francis, M. B., A three-component Mannich-type reaction for selective tyrosine bioconjugation. *J Am Chem Soc*, **2004**, 126, 15942-3.
89. Romanini, D. W.; Francis, M. B., Attachment of peptide building blocks to proteins through tyrosine bioconjugation. *Bioconjug Chem*, **2008**, 19, 153-7.
90. Antos, J. M.; Francis, M. B., Selective tryptophan modification with rhodium carbenoids in aqueous solution. *J Am Chem Soc*, **2004**, 126, 10256-7.
91. Liu, C. F.; Tam, J. P., Peptide segment ligation strategy without use of protecting groups. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1994**, 91, 6584-8.
92. Dirksen, A.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E., Nucleophilic catalysis of oxime ligation. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2006**, 45, 7581-4.
93. Liu, H.; Wang, L.; Brock, A.; Wong, C. H.; Schultz, P. G., A method for the generation of glycoprotein mimetics. *J Am Chem Soc*, **2003**, 125, 1702-3.
94. de Araujo, A. D.; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Seitz, O.; Alexandrov, K.; Waldmann, H., Diels-Alder ligation of peptides and proteins. *Chemistry*, **2006**, 12, 6095-109.
95. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2002**, 41, 2596-9.
96. Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R., Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2007**, 104, 16793-7.
97. Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R., In vivo imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish. *Science*, **2008**, 320, 664-7.
98. Keppler, A.; Gendreizig, S.; Gronemeyer, T.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, K., A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol*, **2003**, 21, 86-9.
99. Keppler, A.; Pick, H.; Arrivoli, C.; Vogel, H.; Johnsson, K., Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2004**, 101, 9955-9.
100. Lemercier, G.; Gendreizig, S.; Kindermann, M.; Johnsson, K., Inducing and sensing protein--protein interactions in living cells by selective cross-linking. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2007**, 46, 4281-4.
101. Banala, S.; Arnold, A.; Johnsson, K., Caged substrates for protein labeling and immobilization. *Chembiochem*, **2008**, 9, 38-41.
102. Beckett, D.; Kovaleva, E.; Schatz, P. J., A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci*, **1999**, 8, 921-9.
103. Yin, J.; Straight, P. D.; McLoughlin, S. M.; Zhou, Z.; Lin, A. J.; Golan, D. E.; Kelleher, N. L.; Kolter, R.; Walsh, C. T., Genetically encoded short peptide tag for versatile protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2005**, 102, 15815-20.
104. Dursina, B. E.; Reents, R.; Niculae, A.; Veligodsky, A.; Breitling, R.; Pyatkov, K.; Waldmann, H.; Goody, R. S.; Alexandrov, K., A genetically encodable microtag for chemo-enzymatic derivatization and purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif*, **2005**, 39, 71-81.
105. Nguyen, U. T.; Cramer, J.; Gomis, J.; Reents, R.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Goody, R. S.; Alexandrov, K.; Waldmann, H., Exploiting the substrate tolerance of farnesyltransferase for site-selective protein derivatization. *Chembiochem*, **2007**, 8, 408-23.
106. Miller, L. W.; Sable, J.; Golet, P.; Sheetz, M. P.; Cornish, V. W., Methotrexate conjugates: a molecular in vivo protein tag. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2004**, 43, 1672-5.
107. Marks, K. M.; Braun, P. D.; Nolan, G. P., A general approach for chemical labeling and rapid, spatially controlled protein inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2004**, 101, 9982-7.
108. Carrico, I. S.; Carlson, B. L.; Bertozzi, C. R., Introducing genetically encoded aldehydes into proteins. *Nat Chem Biol*, **2007**, 3, 321-2.
109. Griffin, B. A.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y., Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science*, **1998**, 281, 269-72.
110. Adams, S. R.; Campbell, R. E.; Gross, L. A.; Martin, B. R.; Walkup, G. K.; Yao, Y.; Llopis, J.; Tsien, R. Y., New biarsenical ligands and tetracycline motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J Am Chem Soc*, **2002**, 124, 6063-76.

111. Wang, Y.; Liu, X.; Hnatowich, D. J., An improved synthesis of NHS-MAG3 for conjugation and radiolabeling of biomolecules with (99m)Tc at room temperature. *Nat Protoc*, **2007**, 2, 972-8.
112. Waibel, R.; Alberto, R.; Willuda, J.; Finnern, R.; Schibli, R.; Stichelberger, A.; Egli, A.; Abram, U.; Mach, J. P.; Pluckthun, A.; Schubiger, P. A., Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex. *Nat Biotechnol*, **1999**, 17, 897-901.
113. Saxon, E.; Bertozzi, C. R., Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science*, **2000**, 287, 2007-10.
114. Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R., A "traceless" Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds. *Org Lett*, **2000**, 2, 2141-3.
115. Nilsson, B. L.; Hondal, R. J.; Soellner, M. B.; Raines, R. T., Protein assembly by orthogonal chemical ligation methods. *J Am Chem Soc*, **2003**, 125, 5268-9.
116. Prescher, J. A.; Dube, D. H.; Bertozzi, C. R., Chemical remodelling of cell surfaces in living animals. *Nature*, **2004**, 430, 873-7.
117. Kohn, M.; Breinbauer, R., The Staudinger ligation-a gift to chemical biology. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2004**, 43, 3106-16.
118. Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B., Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, **1994**, 266, 776-9.
119. Dawson, P. E.; Churchill, M.; Ghadiri, M. R.; Kent, S. B. H., Modulation of reactivity in native chemical ligation through the use of thiol additives. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 4325-4329.
120. Muir, T. W.; Sondhi, D.; Cole, P. A., Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, 95, 6705-10.
121. Severinov, K.; Muir, T. W., Expressed protein ligation, a novel method for studying protein-protein interactions in transcription. *J Biol Chem*, **1998**, 273, 16205-9.
122. Erlanson, D. A.; Chytil, M.; Verdine, G. L., The leucine zipper domain controls the orientation of AP-1 in the NFAT-AP-1-DNA complex. *Chem Biol*, **1996**, 3, 981-91.
123. Blaschke, U. K.; Cotton, G. J.; Muir, T. W., Synthesis of Multi-Domain Proteins Using Expressed Protein Ligation: Strategies for Segmental Isotopic Labeling of Internal Regions. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 9561-9470.
124. Camarero, J. A.; Shekhtman, A.; Campbell, E. A.; Chlenov, M.; Gruber, T. M.; Bryant, D. A.; Darst, S. A.; Cowburn, D.; Muir, T. W., Autoregulation of a bacterial sigma factor explored by using segmental isotopic labeling and NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2002**, 99, 8536-41.
125. Cotton, G. J.; Ayers, B.; Xu, R.; Muir, T. W., Insertion of a synthetic peptide into a recombinant protein framework: a protein biosensor. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 1100-1101.
126. Bang, D.; Kent, S. B., A one-pot total synthesis of crambin. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2004**, 43, 2534-8.
127. Bang, D.; Pentelute, B. L.; Kent, S. B., Kinetically controlled ligation for the convergent chemical synthesis of proteins. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2006**, 45, 3985-8.
128. Yan, L. Z.; Dawson, P. E., Synthesis of peptides and proteins without cysteine residues by native chemical ligation combined with desulfurization. *J Am Chem Soc*, **2001**, 123, 526-33.
129. Tam, J. P.; Yu, Q., Methionine ligation strategy in the biomimetic synthesis of parathyroid hormones. *Biopolymers*, **1998**, 46, 319-27.
130. Quaderer, R.; Hilvert, D., Selenocysteine-mediated backbone cyclization of unprotected peptides followed by alkylation, oxidative elimination or reduction of the selenol. *Chem Commun (Camb)*, **2002**, 2620-1.
131. Chatterjee, C.; McGinty, R. K.; Pellois, J. P.; Muir, T. W., Auxiliary-mediated site-specific peptide ubiquitylation. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2007**, 46, 2814-8.
132. Low, D. W.; Hill, M. G.; Carrasco, M. R.; Kent, S. B.; Botti, P., Total synthesis of cytochrome b562 by native chemical ligation using a removable auxiliary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**, 98, 6554-9.
133. Jackson, D. Y.; Burnier, J.; Quan, C.; Stanley, M.; Tom, J.; Wells, J. A., A designed peptide ligase for total synthesis of ribonuclease A with unnatural catalytic residues. *Science*, **1994**, 266, 243-7.
134. Machova, Z.; von Eggelkraut-Gottanka, R.; Wehofsky, N.; Bordusa, F.; Beck-Sickinger, A. G., Expressed enzymatic ligation for the semisynthesis of chemically modified proteins. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2003**, 42, 4916-8.
135. Mao, H.; Hart, S. A.; Schink, A.; Pollok, B. A., Sortase-mediated protein ligation: a new method for protein engineering. *J Am Chem Soc*, **2004**, 126, 2670-1.
136. Popp, M. W.; Antos, J. M.; Grotenbreg, G. M.; Spooner, E.; Ploegh, H. L., Sortagging: a versatile method for protein labeling. *Nat Chem Biol*, **2007**, 3, 707-8.
137. Evans, T. C., Jr.; Martin, D.; Kolly, R.; Panne, D.; Sun, L.; Ghosh, I.; Chen, L.; Benner, J.; Liu, X. Q.; Xu, M. Q., Protein trans-splicing and cyclization by a naturally split intein from the dnaE gene of *Synechocystis* species PCC6803. *J Biol Chem*, **2000**, 275, 9091-4.
138. Olschewski, D.; Seidel, R.; Miesbauer, M.; Rambold, A. S.; Oesterheld, D.; Winklhofer, K. F.; Tatzelt, J.; Engelhard, M.; Becker, C. F., Semisynthetic murine prion protein equipped with a GPI anchor mimic incorporates into cellular membranes. *Chem Biol*, **2007**, 14, 994-1006.

139. Lew, B. M.; Mills, K. V.; Paulus, H., Characteristics of protein splicing in trans mediated by a semisynthetic split intein. *Biopolymers*, **1999**, 51, 355-62.
140. Lew, B. M.; Mills, K. V.; Paulus, H., Protein splicing in vitro with a semisynthetic two-component minimal intein. *J Biol Chem*, **1998**, 273, 15887-90.
141. Bartolome, B.; Jubete, Y.; Martinez, E.; de la Cruz, F., Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene*, **1991**, 102, 75-8.
142. Sambrook, J.; Russell, D. W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third ed.; Cold spring Harbour Laboratory Press: New York, 2001.
143. Birnboim, H. C.; Doly, J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **1979**, 7, 1513-23.
144. Mullis, K. B.; Faloona, F. A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **1987**, 155, 335-50.
145. Braman, J.; Papworth, C.; Greener, A., Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol Biol*, **1996**, 57, 31-44.
146. Ludwig, C. Chemische Ligation von Multi-Domänen-Proteinen zur segmentellen Isotopenmarkierung. Philipps-Universität, Marburg, 2004.
147. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, 227, 680-5.
148. Bennett, J.; Scott, K. J., Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem*, **1971**, 43, 173-82.
149. Towbin, H.; Stachelin, T. und Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings in the National Academy of Science of the USA*, **1979**, 76, 4350-4354.
150. Gill, S. C.; vonHippel, P. H., Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **1989**, 182, 319-326.
151. Merrifield, R. B., Automated synthesis of peptides. *Science*, **1965**, 150, 178-85.
152. Merrifield, R. B., Solid-Phase Peptide Syntheses. *Endeavour*, **1965**, 24, 3-7.
153. Carpino, L. A.; Han, G. Y., 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *J Am Chem Soc*, **1970**, 92, 5748-5749.
154. Mutter, M.; Nefzi, A.; Sato, T.; Sun, X.; Wahl, F.; Wöhr, T., Pseudo-prolines (psi Pro) for accessing "inaccessible" peptides. *Pept Res*, **1995**, 8, 145-53.
155. White, P.; Keyte, J. W.; Bailey, K.; Bloomberg, G., Expediting the Fmoc solid phase synthesis of long peptides through the application of dimethylloxazolidine dipeptides. *J Pept Sci*, **2004**, 10, 18-26.
156. Coin, I.; Dolling, R.; Krause, E.; Bienert, M.; Beyermann, M.; Sferdean, C. D.; Carpino, L. A., Depsipeptide methodology for solid-phase peptide synthesis: circumventing side reactions and development of an automated technique via depsipeptide units. *J Org Chem*, **2006**, 71, 6171-7.
157. Han, Y.; Albericio, F.; Barany, G., Occurrence and Minimization of Cysteine Racemization during Stepwise Solid-Phase Peptide Synthesis(1)(,)(2). *J Org Chem*, **1997**, 62, 4307-4312.
158. Holmgren, Thioredoxin Catalyzes the Reduction of Insulin Disulfides by Dithiothreitol and Dihydrolipoamide. *JBC*, **1979**, 254, 9627-9632.
159. O'Callaghan, C. H.; Morris, A.; Kirby, S. M.; Shingler, A. H., Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother*, **1972**, 1, 283-8.
160. Michnick, S. W., Exploring protein interactions by interaction-induced folding of proteins from complementary peptide fragments. *Curr Opin Struct Biol*, **2001**, 11, 472-7.
161. Mootz, H. D.; Blum, E. S.; Tyszkiewicz, A. B.; Muir, T. W., Conditional protein splicing: a new tool to control protein structure and function in vitro and in vivo. *J Am Chem Soc*, **2003**, 125, 10561-9.
162. Martin, D. D.; Xu, M. Q.; Evans, T. C., Jr., Characterization of a naturally occurring trans-splicing intein from *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochemistry*, **2001**, 40, 1393-402.
163. Pisabarro, M. T.; Serrano, L.; Wilmanns, M., Crystal structure of the abl-SH3 domain complexed with a designed high-affinity peptide ligand: implications for SH3-ligand interactions. *J Mol Biol*, **1998**, 281, 513-21.
164. Horstmann, N.; Seidel, G.; Aung-Hilbrich, L. M.; Hillen, W., Residues His-15 and Arg-17 of HPr participate differently in catabolite signal processing via CcpA. *J Biol Chem*, **2007**, 282, 1175-82.
165. Jeggle, P. Untersuchungen zum Mechanismus des Proteinspleißens mittels eines semisynthetischen Inteins. Bachelor, TU Dortmund, Dortmund 2007.
166. Cabantous, S.; Terwilliger, T. C.; Waldo, G. S., Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, **2005**, 23, 102-7.
167. Ladurner, A. G.; Itzhaki, L. S.; de Prat Gay, G.; Fersht, A. R., Complementation of peptide fragments of the single domain protein chymotrypsin inhibitor 2. *J Mol Biol*, **1997**, 273, 317-29.
168. Ullmann, A.; Jacob, F.; Monod, J., Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **1967**, 24, 339-43.

169. Ludwig, C.; Pfeiff, M.; Linne, U.; Mootz, H. D., Ligation of a synthetic peptide to the N terminus of a recombinant protein using semisynthetic protein trans-splicing. *Angew Chem Int Ed Engl*, **2006**, *45*, 5218-21.
170. Ando, T.; Tsukiji, S.; Tanaka, T.; Nagamune, T., Construction of a small-molecule-integrated semisynthetic split intein for in vivo protein ligation. *Chem Commun (Camb)*, **2007**, 4995-7.
171. Xu, M. Q.; Paulus, H.; Chong, S., Fusions to self-splicing inteins for protein purification. *Methods Enzymol*, **2000**, *326*, 376-418.
172. Nichols, N. M.; Evans, T. C., Jr., Mutational analysis of protein splicing, cleavage, and self-association reactions mediated by the naturally split Ssp DnaE intein. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 10265-76.
173. Marinzi, C.; Offer, J.; Longhi, R.; Dawson, P. E., An o-nitrobenzyl scaffold for peptide ligation: synthesis and applications. *Bioorg Med Chem*, **2004**, *12*, 2749-57.
174. Offer, J.; Boddy, C. N.; Dawson, P. E., Extending synthetic access to proteins with a removable acyl transfer auxiliary. *J Am Chem Soc*, **2002**, *124*, 4642-6.
175. Kinsella, T. M.; Ohashi, C. T.; Harder, A. G.; Yam, G. C.; Li, W.; Peelle, B.; Pali, E. S.; Bennett, M. K.; Molineaux, S. M.; Anderson, D. A.; Masuda, E. S.; Payan, D. G., Retrovirally delivered random cyclic Peptide libraries yield inhibitors of interleukin-4 signaling in human B cells. *J Biol Chem*, **2002**, *277*, 37512-8.
176. Hackeng, T. M.; Griffin, J. H.; Dawson, P. E., Protein synthesis by native chemical ligation: expanded scope by using straightforward methodology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1999**, *96*, 10068-73.
177. Chattopadhyaya, S.; Srinivasan, R.; Yeo, D. S.; Chen, G. Y.; Yao, S. Q., Site-specific covalent labeling of proteins inside live cells using small molecule probes. *Bioorg Med Chem*, **2008**.
178. Lue, R. Y.; Chen, G. Y.; Hu, Y.; Zhu, Q.; Yao, S. Q., Versatile protein biotinylation strategies for potential high-throughput proteomics. *J Am Chem Soc*, **2004**, *126*, 1055-62.
179. Schütz, V. Biochemische Charakterisierung des Npu DnaE Inteins. Masterarbeit, TU Dortmund, Dortmund, 2008.
180. Shi, J.; Muir, T. W., Development of a tandem protein trans-splicing system based on native and engineered split inteins. *J Am Chem Soc*, **2005**, *127*, 6198-206.
181. Kippen, A. D.; Sancho, J.; Fersht, A. R., Folding of barnase in parts. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 3778-86.
182. Binschik, J. Entwicklung und biochemische Charakterisierung eines photoschaltbaren Inteins. Masterarbeit, TU Dortmund, Dortmund, 2008.
183. Li, Y.-M.; Milne, J. C.; Madison, L. L.; Kolter, R.; Walsh, C. T., From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: Microcin B17 Synthase. *Science*, **1996**, *274*, 1188-1193.
184. Roy, R. S.; Gehring, A. M.; Milne, J. C.; Belshaw, P. J.; Walsh, C. T., Thiazole and oxazole peptides: biosynthesis and molecular machinery. *Nat Prod Rep*, **1999**, *16*, 249-63.
185. Ratti, E.; Lauinger, C.; Ressler, C., Configuration of the asparaginyl and aspartyl residues of bacitracin. *J Org Chem*, **1968**, *33*, 1309-10.
186. Haag, H.; Hantke, K.; Drechsel, H.; Stojiljkovic, I.; Jung, G.; Zahner, H., Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J Gen Microbiol*, **1993**, *139*, 2159-65.
187. Snow, G. A., Mycobactins: iron-chelating growth factors from mycobacteria. *Bacteriol Rev*, **1970**, *34*, 99-125.
188. Evans, T. C., Jr.; Benner, J.; Xu, M. Q., The in vitro ligation of bacterially expressed proteins using an intein from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J Biol Chem*, **1999**, *274*, 3923-6.
189. Otomo, T.; Ito, N.; Kyogoku, Y.; Yamazaki, T., NMR observation of selected segments in a larger protein: central-segment isotope labeling through intein-mediated ligation. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 16040-4.
190. Johnsson, N.; Varshavsky, A., Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1994**, *91*, 10340-4.
191. Pelletier, J. N.; Campbell-Valois, F. X.; Michnick, S. W., Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, *95*, 12141-6.
192. Galarneau, A.; Primeau, M.; Trudeau, L. E.; Michnick, S. W., Beta-lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein protein interactions. *Nat Biotechnol*, **2002**, *20*, 619-22.
193. Paulmurugan, R.; Gambhir, S. S., Monitoring protein-protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation. *Anal Chem*, **2003**, *75*, 1584-9.
194. Magliery, T. J.; Wilson, C. G.; Pan, W.; Mishler, D.; Ghosh, I.; Hamilton, A. D.; Regan, L., Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism. *J Am Chem Soc*, **2005**, *127*, 146-57.
195. Kent, K. P.; Childs, W.; Boxer, S. G., Deconstructing green fluorescent protein. *J Am Chem Soc*, **2008**, *130*, 9664-5.
196. Raines, R. T., Ribonuclease A. *Chem Rev*, **1998**, *98*, 1045-1066.
197. Park, S. H.; Raines, R. T., Fluorescence polarization assay to quantify protein-protein interactions. *Methods Mol Biol*, **2004**, *261*, 161-6.

8 Anhang

Tabelle 12. Übersicht der Peptide

Peptid	Kurz- beschreibung	Sequenz (NH ₂ -Ex ^N -Int ^N -COOH)	Masse [Da]	k _{on} [M ⁻¹ s ⁻¹]	K _d [μM]	ber. k _{off} [10 ⁻⁵ s ⁻¹]	Name Laborbuch
Pep1	Int(1-12)-R	FI-SEFSG-CISGDSLISLASR	2185,9	24,8 ± 0,7	0,7 ± 0,1	1,7	PepCL01
Pep2	Int(1-12)	FI-KKESG-CISGDSLISLAS	2051,9	19,5 ± 0,5	0,9 ± 0,01	1,8	PepCL08
Pep3	Int(1-11) (Ref)	FI-KKESG-CISGDSLISLA	1964,9	16,8 ± 1,0	1,1 ± 0,2	1,8	PepCL06
Pep4	Int(1-10)	FI-KKESG-CISGDSLISL	1893,8	0,4 ± 0,1	29,1 ± 4,3	1,2	PepCL36
Pep5	Int(1-9)	FI-KKESG-CISGDSLIS	1780,8	n.d.*	n.d.*	-	PepCL37
Pep6	Int(1-5)	FI-KKESG-CISGD	1380,5	n.d.*	n.d.*	-	PepCL10
Pep7	Cys1Ala	FI-KKESG-AISGDSLISLA	1932,9	11,1 ± 1,2	1,2 ± 0,3	1,3	PepCL12
Pep8	Ile2Ala	FI-KKESG-CASGDSLISLA	1922,8	2,5 ± 0,2	12,3 ± 4,1	3,1	PepCL13
Pep9	Ser3Ala	FI-KKESG-CIAGDSLISLA	1948,9	16,7 ± 2,2	0,9 ± 0,2	1,5	PepCL14
Pep10	Gly4Ala	FI-KKESG-CISADSLISLA	1978,9	9,5 ± 0,6	1,9 ± 1,1	1,8	PepCL15
Pep11	Asp5Ala	FI-KKESG-CISGASLISLA	1920,9	4,3 ± 0,6	3,7 ± 1,1	1,6	PepCL16
Pep12	Ser6Ala	FI-KKESG-CISGDALISLA	1948,9	23,3 ± 1,8	1,0 ± 0,6	2,3	PepCL17
Pep13	Leu7Ala	FI-KKESG-CISGDSAISLA	1922,8	2,2 ± 0,3	6,1 ± 1,5	1,3	PepCL18
Pep14	Ile8Ala	FI-KKESG-CISGDSLASLA	1922,8	0,7 ± 0,04	18,4 ± 4,6	1,3	PepCL19
Pep15	Ser9Ala	FI-KKESG-CISGDSLIALA	1948,9	13,4 ± 0,8	1,1 ± 0,03	1,5	PepCL20
Pep16	Leu10Ala	FI-KKESG-CISGDSLISAA	1922,9	0,6 ± 0,06	26,9 ± 2,4	1,6	PepCL21
Pep17	Gly[-1]Ala	FI-KKESA-CISGDSLISLA	1978,9	22,0 ± 0,7	2,3 ± 0,1	5,1	PepCL22
Pep18	C-Amid	FI-KKESG-CISGDSLISLA-NH ₂	1963,8	22,8 ± 0,7	0,9 ± 0,05	2,1	PepCL07
Pep19	Gly[-1]DAla	FI-KKES(DA)-CISGDSLISLA	1978,9	10,3 ± 0,4	3,3 ± 0,1	3,4	PepCL34
Pep20	Gly[-1]βAla	FI-KKES(βA)-CISGDSLISLA	1978,9	22,8 ± 0,9	1,0 ± 0,05	2,3	PepPJ01
Pep21	Gly[-1]Sar	FI-KKES(Sar)-CISGDSLISLA	1978,9	15,5 ± 0,7	2,1 ± 0,2	3,3	PepPJ02
Pep22	Gly[-1]Sar Ser[-2]Ala	FI-KKEA(Sar)-CISGDSLISLA	1962,9	n.g. [#]	n.g. [#]	-	PepCL38
Pep23	Cys1HCys	FI-KKESG-(HC)ISGDSLISLA	1978,8	17,8 ± 0,8	1,2 ± 0,05	2,1	PepCL26
Pep24	Cys1DCys	FI-KKESG-(DC)ISGDSLISLA	1964,8	21,2 ± 0,9	0,5 ± 0,2	1,1	PepCL27

* n.d. = nicht detektierbar

n.g. = nicht gemessen

ber. = berechnet

Die fett-gedruckten Buchstaben in Spalte 3 markieren die im Vergleich zum Referenzpeptid Pep3 zusätzlich eingeführten oder substituierten Aminosäuren. Folgende Abkürzungen für unnatürliche Aminosäurebausteine wurden verwendet: βAla = beta-Alanin, Sar = Sarcosin, HCys = Homo-Cystein, DCys = Cystein in D-Konfiguration.

Tabelle 13. Übersicht der Proteinkonstrukte

Nr.	Kurzbeschreibung	Masse* (Da)	Molarer Extinktions- koeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Vektor	Plasmid- Name	Resistenz (Expressions- plasmid)
1	Strep-Trx-Int ^N (1-12)-R	14798,9	19990	pET16b	pCL14	Amp ¹⁰⁰
1a	Strep-Trx-Int ^N (1-12, Cys1Ala)-R	14766,8	19870	pET16b	pCL27	Amp ¹⁰⁰
2	Int ^C (12-154)-His ₆	18078,5	19750	pSU38	pCL11	Kan ⁵⁰
7	Int ^C (12-154)-Trx-His ₆	30212,4	33930	pSU38	pCL20	Kan ⁵⁰
7a	Int ^C (12-154)-Trx(Ser[+1]Ala)-His ₆	30196,4	33930	pSU38	pCL28	Kan ⁵⁰
7b	Int ^C (12-154, Asn154Ala)- Trx(Ser[+1]Ala)-His ₆	30153,4	33930	pSU38	pMP06	Kan ⁵⁰
7c	Int ^C (12-154, His73Ala, Asn154Ala)-Trx(Ser[+1]Ala)-His ₆	30087,3	33930	pSU38	pPJ03	Kan ⁵⁰
10	Int ^C (12-154)-βLac-His ₆	47253,0	47870	pSU38	pHM137	Kan ⁵⁰
14	MBP-Int ^N (1-12)-R	44274,9	64840	pET16b	pCL13	Amp ¹⁰⁰
16	Int ^C (6-154)-βLac-His ₆	47892,8	47870	pQE60	pCL44	Amp ¹⁰⁰
17	Int ^C (3-154)-βLac-His ₆	48094,9	47870	pET22b	pCL65	Amp ¹⁰⁰
18	Int ^C (2-154)-βLac-His ₆	48265,1	47870	pQE60	pCL50	Amp ¹⁰⁰
19	Int ^C (12-429)-Trx-His ₆	61434,3	71130	pET16b	pCL38	Amp ¹⁰⁰
20	MBP-Int ^N (1-104, Cys50Ser)-His ₆	56260,6	78780	pET28a	pNB05	Kan ⁵⁰
21	MBP(Gly[-1]Ala)-Int ^N (1-104, Cys50Ser)-His ₆	56274,7	78780	pET28a	pCL78	Kan ⁵⁰
22	MBP- Int ^C (105-154, Asn154Ala)- Trx(Ser[+1]Ala)-His ₆	62096,9	85870	pMAL- c2x	pCL77	Amp ¹⁰⁰

*Angabe immer ohne Startmethionin

Tabelle 14. Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Name	Beschreibung (eingeführte Restriktionsschnittstellen)	Länge [bp]	5'→3'-Sequenz
oCL31	5'-Primer, Einführung von Trx als C-Extein in pCL20 (<i>Bam</i> HI)	37	ATAGGATCCGGAGGAGGA TCTGATAAAAATTATTCATC
oCL32	3'-Primer, Einführung von Trx als C-Extein in pCL20 (<i>Bam</i> HI)	28	TATGGATCCAGAGCCGGCC AGGTTAGCG
oCL34	Einführung Punktmutation Cys1Ala in pCL27 (<i>Hae</i> II)	32	TCTGAATTCTCCGGCGCCA TCAGTGGAGATAG
oCL34-r	Einführung Punktmutation Cys1Ala in pCL27 (<i>Hae</i> II)	32	CTATCTCCACTGATGGCGC CGGAGAATTCAGA
oCL35	Einführung Punktmutation Ser[+1]Ala in pCL28 (<i>Pvu</i> I)	41	GACATCATTGTCCATAACG CGATCGAAGGATCCGGAG GAGG
oCL35-r	Einführung Punktmutation Ser[+1]Ala in pCL28 (<i>Pvu</i> I)	41	CCTCCTCCGGATCCTTCGA TCGCGTTATGGACAATGAT GTC
oCL45	5'-Primer, Darstellung von Int ^C (5-154) in pCL44, (<i>Nco</i> I)	31	ATACCATGGGCAGTTTGAT CAGCTTGGCGAG
oCL47	5'-Primer, Darstellung Int ^C (2-154) in pCL50 (<i>Nco</i> I)	32	ATACCATGGGCATCAGTGG AGATAGTTTGATC
oCL48	5'-Primer, Darstellung Int ^C (3-154) in pCL65 (<i>Nde</i> I)	29	ATACATATGAGTGGAGATA GTTTGATCAG
oCL69	Einführung Punktmutation His73Ala in pPJ03	35	CAAGGCAACAGCAAATGC TAGATTTTAACTATTG
oCL69-r	Einführung Punktmutation His73Ala in pPJ03	35	CAATAGTAAAAATCTAGC ATTTGCTGTTGCCCTTG
oCL70	Einführung Punktmutation Gly[-1]Ala in pCL78 (<i>Sph</i> I)	36	GATTTCAGAATTCTCCGCA TGCATCAGTGGAGATAG
oCL70-r	Einführung Punktmutation Gly[-1]Ala in pCL78 (<i>Sph</i> I)	36	CTATCTCCACTGATGCATG CGGAGAATTCTGAAATC
oCL73	Einführung Punktmutationen Asn154Ala und Ser[+1]Ala in pCL77 (<i>Sph</i> I)	50	GTCGCCAATGACATCATTG TGCATGCGGCGATTGAAG GATCCGGAGGAGG
oCL73-r	Einführung Punktmutationen Asn154Ala und Ser[+1]Ala in pCL77(<i>Sph</i> I)	50	CCTCCTCCGGATCCTTCAAT CGCCGCATGCACAATGATG TCATTGGCGAC CCGCTG
oHM106	5'-Primer, Einführung des N-terminalen Strep Tag II und von Trx als N-Extein in pCL14 (<i>Nco</i> I)	60	ATACCATGGCCGCCTTGAGC CACCCGCAGTTCGAAAAAGG ATCTGATAAAAATTATTCATC
oHM107	3'-Primer, Einführung von Trx als N-Extein in pCL14 (<i>Eco</i> RI)	28	ATAGAATTCAGAGCCGGCCA GGTTAGCG
oHM128	5'-Primer, Einführung von MBP-Int ^N (1-12)-R in pCL13 (<i>Nco</i> I)	30	ATACCATGGAAATCGAAGAA GGTAAACTGG
oHM129	3'-Primer, Einführung von MBP-Int ^N (1-12)-R in pCL13 (<i>Hind</i> III)	37	ATAAAGCTTATCTAGACGCCA AGCTGATCAAATATC
oHM116	5'-Primer, Darstellung Int ^C (105-154)-Trx-His in pCL77 (<i>Spe</i> I)	40	ATACCATGGGCACTAGTTC ACCAGAAATAGAAAAGTT GTC
oHM130	5'-Primer, Darstellung Int ^C (12-154) in pCL11 und Int ^C (12-429) in pCL38 (<i>Nco</i> I)	37	ATACCATGGGCACTAGTAGC ACAGGAAAAAGAGTTTC
oHM131	3'-Primer, Darstellung von Int ^C (12-154) in pCL11 und pCL38, Int ^C (5-154) in pCL44, Int ^C (2-154) in pCL50, (<i>Bam</i> HI)	40	ATAGGTACCGGATCCTTCA ATACTGTTATGGACAATGA TG
oHM135	3'-Primer, Darstellung Int ^C (3-154) in pCL65 und Int ^C (105-154)-Trx-His in pCL77 (<i>Hind</i> III)	28	ATAAAGCTTAGTGATGGTG ATGGTGATG
oHM138	Einführung Punktmutation Cys50Ser in NB05 (<i>Sca</i> I)	31	GTTAGTCGTGATTTAGT ACTGGCAAAAAGC

Name	Beschreibung (eingeführte Restriktionsschnittstellen)	Länge [bp]	5'→3'-Sequenz
oHM139	Einführung Punktmutation Cys50Ser in NB05 (<i>ScaI</i>)	31	GCTTTTGGCCAGTACTAA ATACACGACTAAC
oHM148	5'-Primer, Einführung von β Lac als C-Extein in pHM137 (<i>Bam</i> HI)	37	ATAGAATTCGGATCCCACCC AGAAACGCTGGTCAAAG
oHM149	3'-Primer, Einführung von β Lac als C-Extein in pHM137 (<i>Bgl</i> II)	35	ATAAAGCTTAGATCTCCAAT GCTTAATCAGTGAGG
oMP03	Einführung Punktmutationen Asn154Ala in pMP06 (<i>Sph</i> I)	38	CCAATGACATCATTGTGCAT GCCGCGATCGAAGGAGGA
oMP03-r	Einführung Punktmutationen Asn154Ala in pMP06 (<i>Sph</i> I)	38	TCCTCCTTCGATCGCGGCAT GCACAATGATGTCATTGG

Evaluierung der totalen Fluoreszenzintensität des Fluorophors in freier und gebundener Form

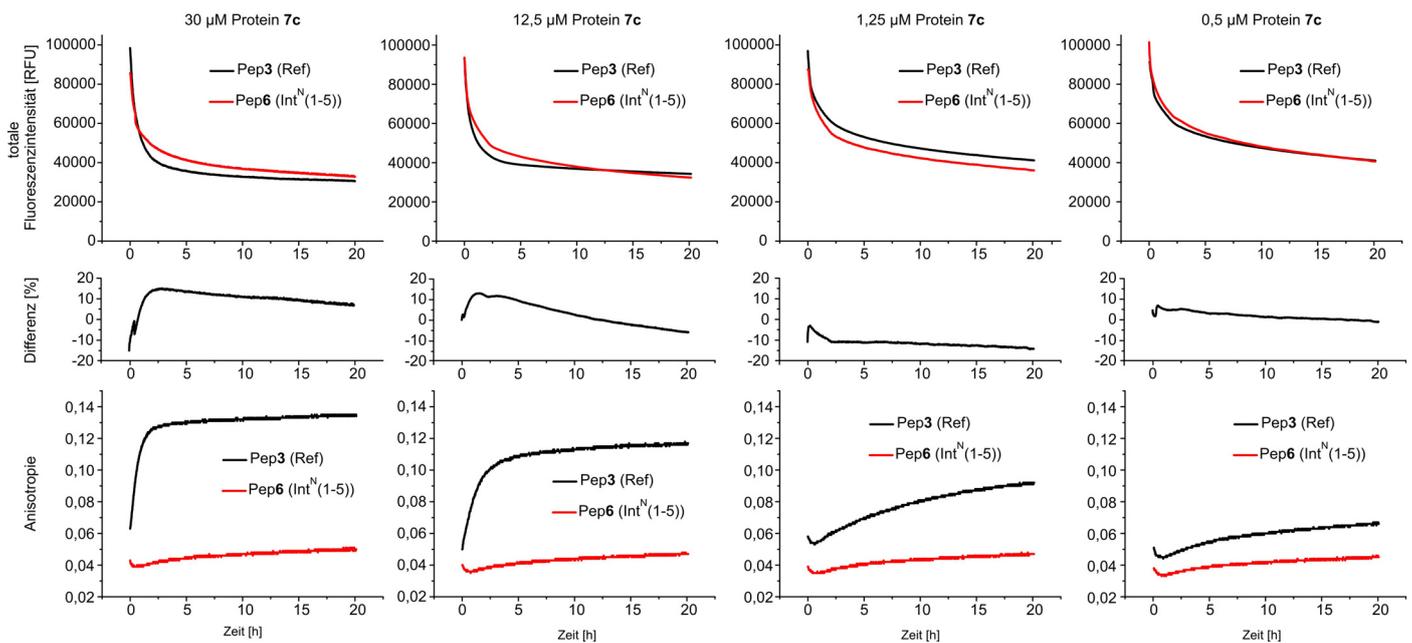


Abbildung 50. Vergleichende Untersuchung des komplexbildenden Referenzpeptids Pep3 und des nicht assoziierenden Peptids Pep6. Gezeigt ist, von oben nach unten gelesen, der Verlauf der totalen Fluoreszenzintensität, die relative Differenz dieser Intensität zwischen Pep3 (FI-KKESG-Int^N(1-11)) und Pep6 (FI-KKESG-Int^N(1-5)) und der Verlauf der Fluoreszenz-Anisotropie bei 4 verschiedenen Konzentrationen der Tripelmutante **7c** (Int^C(12-154, H73A, N154A)-Trx(S[+1]A)-His₆). Die Peptidkonzentration betrug in jedem Experiment 1 µM. Im Gegensatz zu den gezeigten Fluoreszenz-Anisotropie-Daten in Abbildung 29 wurde die Hintergrund-Anisotropie des freien Peptids ohne Proteinzugabe in dieser Abbildung nicht subtrahiert.

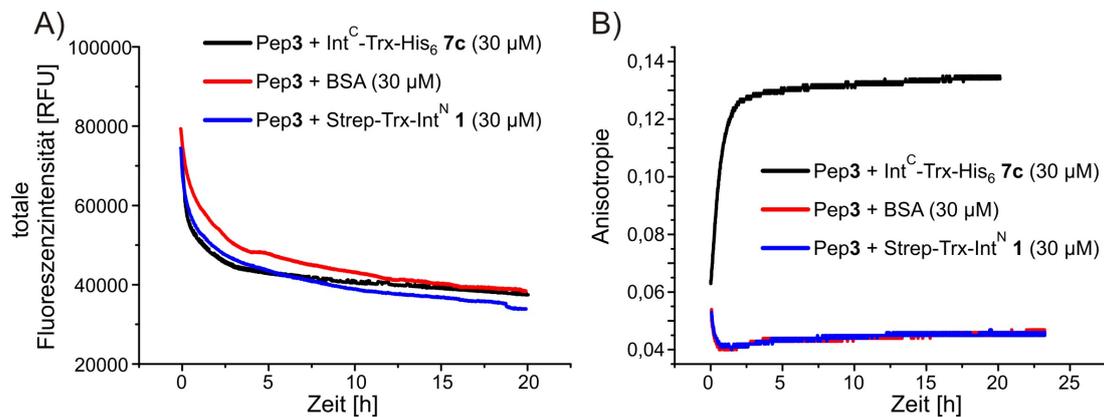


Abbildung 51. Analyse des Verlaufs der totalen Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenz-Anisotropie mit zwei nicht-bindenden Proteinen als Negativkontrollen. **A)** Eine Umsetzung des Referenzpeptids Pep3 (je 1 µM) mit den zwei nicht bindenden Proteinen Rinderserumalbumin (BSA, rot) und Konstrukt **1** (Strep-Trx-Int^N, blau) zeigte im Vergleich zur Referenzreaktion mit Protein **7c** (schwarz) einen vergleichbaren Verlauf der totalen Fluoreszenzintensität. **B)** Die entsprechenden Daten zur Fluoreszenz-Anisotropie zeigten, dass mit beiden Negativkontrollen keine Komplexbildung beobachtet werden konnte (rote und blaue Kurve) und lediglich im Fall der Referenzreaktion (schwarze Kurve) die typische Zunahme der Anisotropie auf einen Maximalwert von ca. 0,13 auftrat. Auch in dieser Abbildung wurde die Hintergrund-Anisotropie des freien Peptids ohne Proteinzugabe nicht subtrahiert.

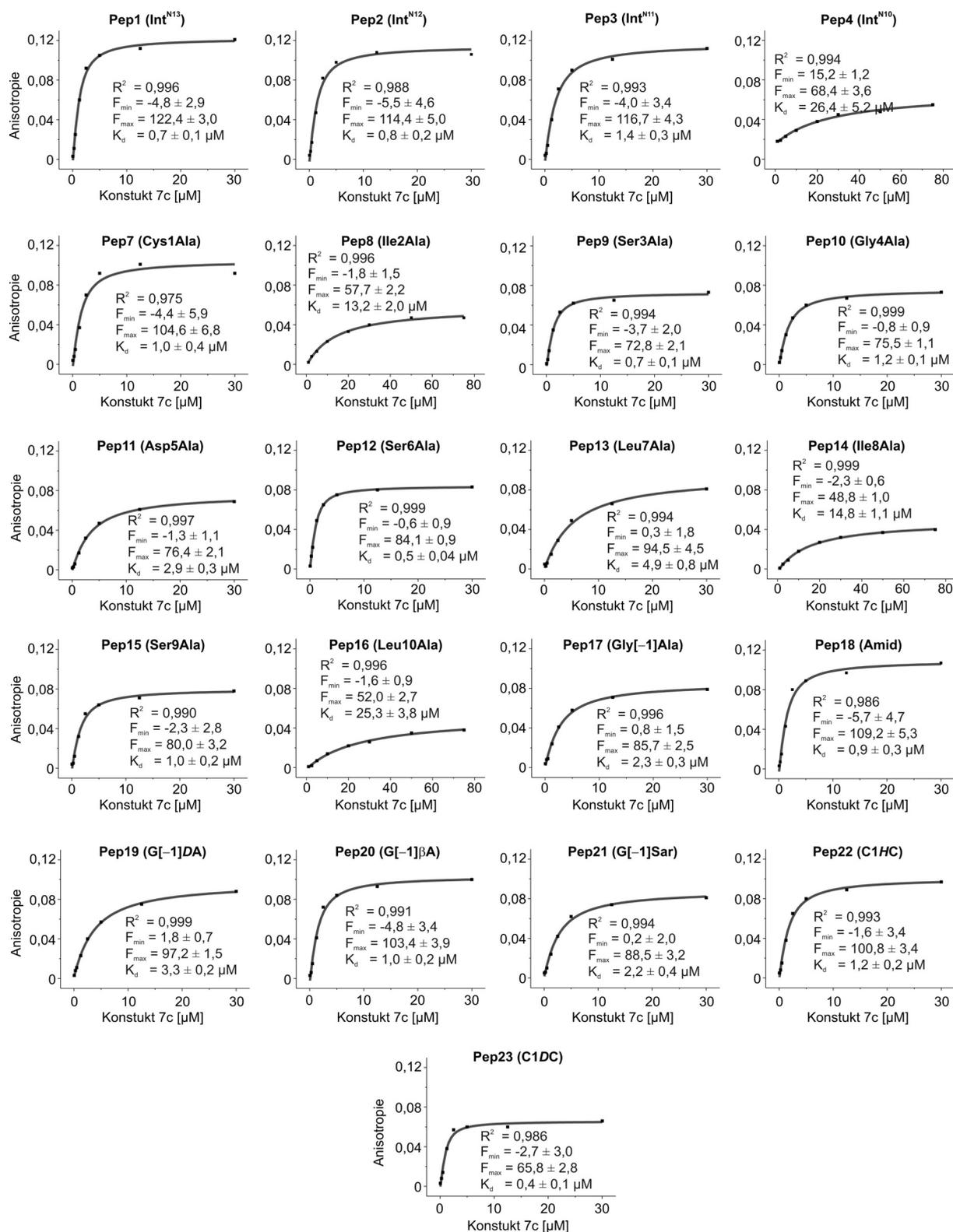
Übersicht K_d -Wert-Bestimmung aller Peptide

Abbildung 52. K_d -Wert-Bestimmung aller Peptide. Fast jedes Peptid dieser Arbeit (Ausnahme Pep22) wurde mit einer konstanten Konzentration von $1 \mu\text{M}$ mit variierenden Konzentrationen an Tripelmutante 7c (zwischen $0,05$ und $30 \mu\text{M}$, in Einzelfällen auch bis zu $75 \mu\text{M}$) umgesetzt. Dargestellt sind die Auftragungen der maximalen Fluoreszenz-Anisotropie jeder dieser Reaktionen in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration 7c. Eine Angleichung dieser Daten mit Gl. 18 lieferte den K_d -Wert. Gezeigt ist jeweils lediglich eine von mindestens zwei unabhängigen K_d -Wert-Bestimmungen. Die in Tabelle 12 wiedergegebenen Daten entsprechen dem Mittelwert aus diesen Messungen und können daher etwas von den in dieser Übersicht bestimmten K_d -Werten abweichen.

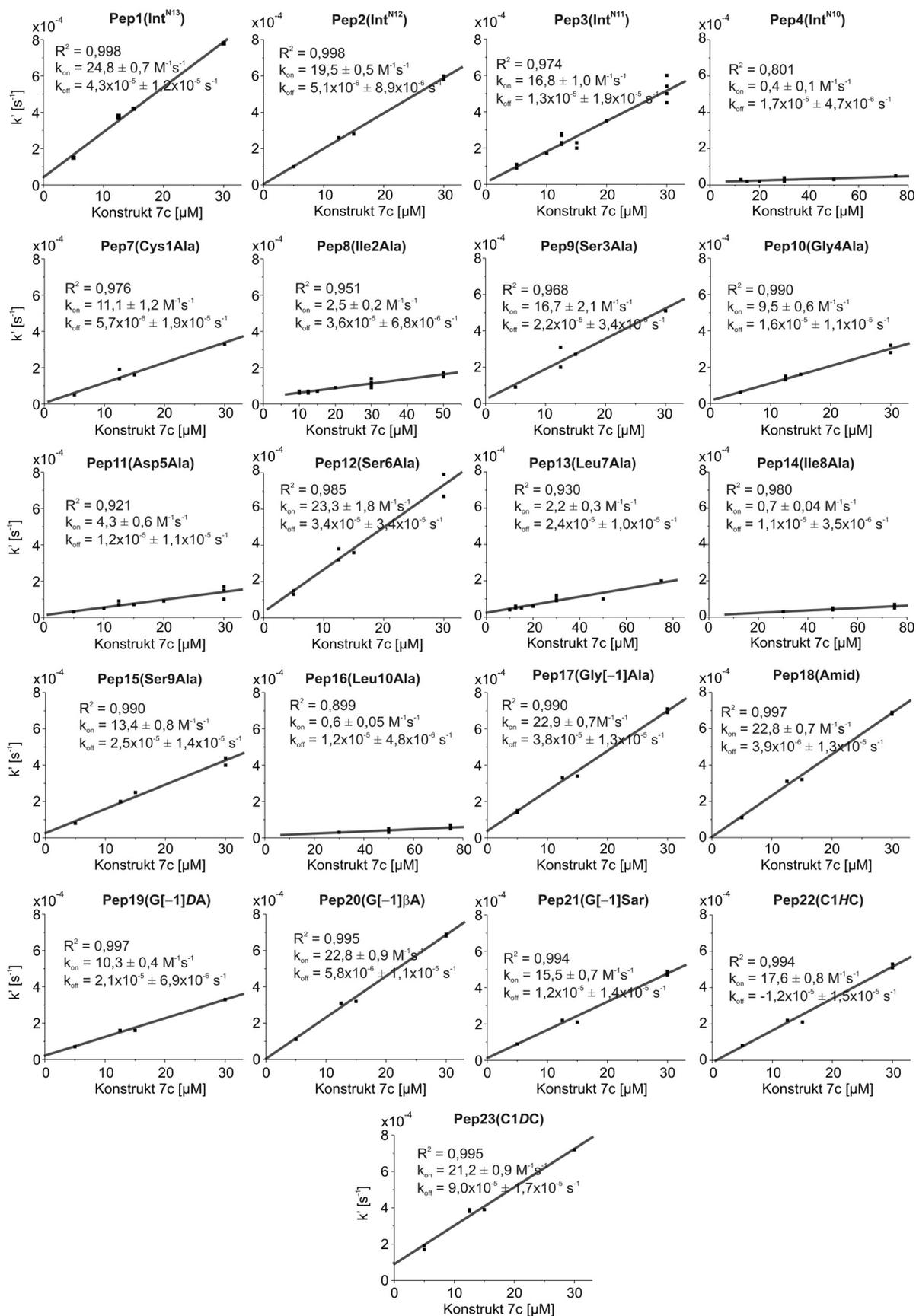
Übersicht k_{on} -Wert-Bestimmung aller Peptide

Abbildung 53. k_{on} -Wert-Bestimmung aller Peptide. Durch die Auftragung von k' (Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration $7c$, konnte k_{on} mittels linearer Regression bestimmt werden (Gl. 19). Der k_{off} -Wert ergab sich aus dem Y-Achsenabschnitt.

9 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Henning Mootz für das sehr interessante Thema und seine tolle Betreuung während der gesamten Doktorarbeit bedanken. Sein eigenes begeisterndes Interesse an meiner Arbeit und sein nie endendes Repertoire an neuen Ideen haben mich stets motiviert und zum guten Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen. Auch persönlich hat mich Henning immer nach besten Kräften unterstützt, sei es bei der Bewerbung um ein Doktorandenstipendium oder bei meinem Tagungsbesuch in Australien, wofür ich ihm sehr dankbar bin.

Herrn Professor Martin Engelhard danke ich recht herzlich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dem gesamten AK-Mootz danke ich für die tolle Zusammenarbeit und die stets freundliche und hilfsbereite Stimmung im Labor. Mein besonderer Dank gilt dabei den „alten Mootz-Männern“ (Steffen Brenzel, Daniel Garbe, Dr. Thomas Kurpiers, Tim Sonntag und Joachim Zettler), die alle beim Laborumzug von Marburg nach Dortmund, und beim Neuaufbau in Dortmund tatkräftig mit angepackt haben. Für die schnelle und kritische Korrektur dieser Arbeit danke ich Steffen Brenzel, Tim Sonntag, Thomas Kurpiers, Jens Binschik und Kim Petsch.

Ein ehemaliger „Mootz-Mann“, bei dem ich mich ganz besonders bedanken möchte, ist Dr. Dirk Schwarzer, der mich in die „Welt der Peptidsynthese“ eingeführt hat. Dank Dirks kompetenter und freundlicher Hilfe konnten wir die Festphasenpeptidsynthese innerhalb weniger Wochen in unserem Labor in Dortmund etablieren. Dies war zum Gelingen dieser Doktorarbeit ein sehr wichtiger Schritt. Daher möchte ich mich bei Dirk herzlich für diese praktische Unterstützung, aber auch für die vielen sehr lehrreichen wissenschaftlichen und manchmal nur lustigen Diskussionen in Labor Nr. C2-05-104 bedanken.

Ebenfalls dankend erwähnen möchte ich an dieser Stelle Frau Birgit Thormann, die mir und dem ganzen Arbeitskreis Mootz in verwaltungstechnischen Aufgaben eine große Hilfe war. Mit ihrer warmherzigen Art und durch die „kleinen Schwätzchen“ zwischendurch hat Birgit von Anfang an dazu beigetragen, dass ich mich an der Universität Dortmund sehr wohl gefühlt habe.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Vertiefungsstudenten, meiner Bachelorstudentin Pia Jeggle und meiner Diplomandin Alexandra Wasmuth bedanken, die alle auf die ein oder andere Weise Beiträge zu dieser Arbeit geleistet haben.

Aufgrund der guten Zusammenarbeit der Universität Dortmund mit dem „Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie“ oder dem „Chemical Genomics Centre“ möchte ich mich bei einer Vielzahl weiterer Personen bedanken, die mir während der letzten Jahre bei den verschiedensten auftretenden Problemen und Fragestellungen zur Seite gestanden haben: Petra Janning danke ich für ihre exzellente Unterstützung bei allen ESI-Messungen. Bei Prof. Dr. Roger Goody und Dr. Ali Kinkhabwala bedanke ich mich für die äußerst hilfreichen Diskussionen zur Fluoreszenz-Anisotropie. Dr. Claus Ceslik und Dr. Lucas Brunsfeld danke ich für die freundliche Bereitstellung der Fluoreszenzspektrometer ihrer Arbeitskreise, sowie für die Einweisungen und die Hilfestellungen bei den durchgeführten Messungen. In diesem Zusammenhang war mir auch Dorothee Wasserberg immer eine große Hilfe. Bei Dr. Hans-Dieter Arndt möchte ich mich für den Zugang zum Peptidsyntheser seiner Arbeitsgruppe recht herzlich bedanken, welchen ich intensiv in Anspruch genommen habe. Dirk Weinrich

danke ich für die tolle Einweisung in das Gerät, und für die immer hilfsbereite Unterstützung bei jeder auftretenden und unvorhersehbaren Fehlfunktion (und das waren einige).

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Stefanie Kiefer vom „Fonds der Chemischen Industrie“, die mich während meiner Zeit als Fond-Stipendiatin bei allen Fragen, und besonders bei der Organisation der Teilnahme am „Chemical Protein Synthesis Meeting“ in Australien, besonders freundlich unterstützt hat.

Zum Schluss bleibt mir nur noch mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben zu bedanken. Hier zu gehören meine Eltern und meine ganze Familie im fernen Hessenland, die mir schon mein ganzes Leben lang jegliche Unterstützung zuteil werden ließen. Mein persönlichster Dank gilt meinem Freund Kim Petsch, der trotz meiner Einwände und den vielen Risiken den Mut hatte alles hinter sich zu lassen, um mit mir zusammen nach Dortmund zu kommen. Erst durch seine grenzenlose Unterstützung in allen Lebenslagen, durch seine immer neuen Ideen für gemeinsame Abenteuer und durch den liebevollen gemeinsamen Alltag ist Dortmund für mich zu einem neuen Zuhause geworden.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Protein-Semisynthese und mechanistische Studien zum Proteinspleißen mit Hilfe eines gespaltenen Inteins“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)