

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.