Fachbereich Biologie/Chemie

Abteilung Biochemie

Chemische Totalsynthese der γ-Untereinheit der *Escherichia coli* ATP-Synthase und Rekonstitution des $(\alpha\beta)_3\gamma$-Minimalkomplexes

Dissertation zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Eingereicht am Fachbereich Biologie/Chemie der

Universität Osnabrück

von

Dipl. Chem. Frank Wintermann

Osnabrück, im November 2012

Hauptberichterstatter: apl. Prof. Dr. Siegfried Engelbrecht-Vandré

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Engelhard

1 Einleitung

1.1 ATP

Lebewesen sind offene Systeme, die zu ihrer Aufrechterhaltung die ständige Zufuhr von Energie benötigen. Für die schnelle und ubiquitäre Verfügbarkeit von Energie, sozusagen als „Energiewährung“, verwenden alle bekannten Lebensformen Adenosintriphosphat (ATP). Aufgrund seiner Struktur hat ATP ein hohes Phosphatgruppenübertragungspotential, seine Hydrolyse liefert unter Standardbedingungen etwa 30 kJ/mol. Damit liegt ATP ungefähr in der Mitte im Vergleich zu anderen, ähnlich reaktiven Verbindungen wie Phosphoenolpyruvat, 1,3-Bisphosphoglycerat, Creatinphosphat, Pyrophosphat, Adenosinmonophosphat oder Glycerol-1-phosphat.

ATP gehört zur Stoffklasse der Nukleotide und besteht aus drei verschiedenen Bausteinen, der Base Adenin, dem Zucker Ribose und drei, durch Phosphoanhydridbindungen miteinander verbundenen Phosphatgruppen (Abbildung 1-1). Letztere werden durch die elektrostatische Abstoßung der negativ geladenen Phosphatgruppen sowie durch die Mesomeriestabilisierung und Hydratation der entstehenden Produkte labil und somit reaktiv. Beim Phosphoenolpyruvat mit seiner doppelt so großen freien Enthalpie von ca. -62 kJ/mol spielt außerdem noch die Produktmolekül-Tautomerisierung eine wesentliche Rolle.

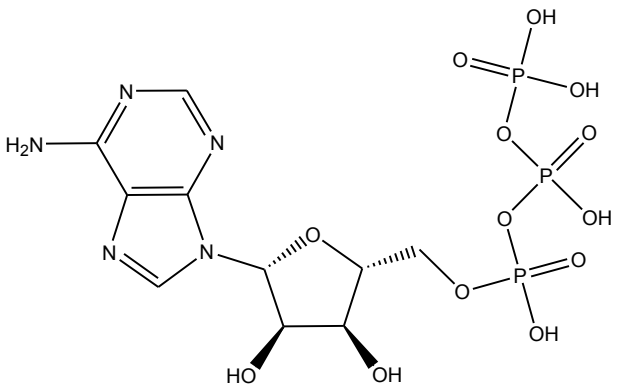


Abbildung 1-1: Struktur von Adenosintriphosphat (ATP)

ATP dient als Lieferant freier Energie, indem seine exergone Hydrolyse an endergone Prozesse gekoppelt wird (Abbildung 1-2). Meist geschieht das durch Phosphorylierung eines Reaktionspartners, der dadurch reaktionsfreudiger wird. Die schlichte Hydrolyse in wässriger Umgebung wäre Energieverschwendung, sie ist daher kinetisch gehemmt. Im Hinblick auf den täglichen Energiebedarf lässt sich errechnen, dass pro Tag der Gesamtumsatz von ATP im Bereich von annähernd der Körpermasse eines Erwachsenen liegt.

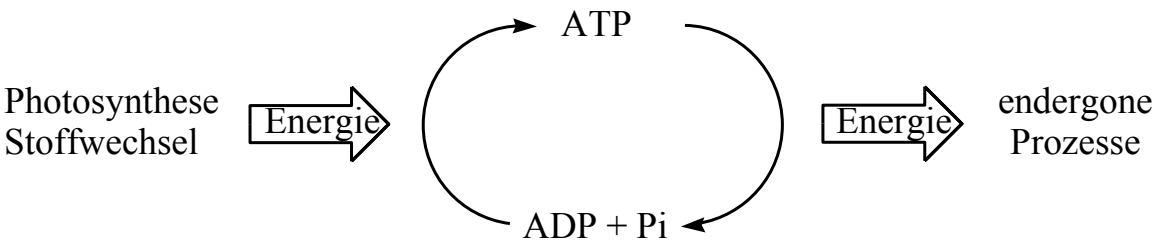


Abbildung 1-2 : ATP als universeller Energieüberträger

ATP wird durch drei Prozesse in lebenden Systemen bereitgestellt: Photophosphorylierung, oxidative Phosphorylierung und Substratkettenphosphorylierung. Da unter heutigen terrestrischen Bedingungen das Sonnenlicht die primäre Energiequelle ist, macht das durch Photophosphorylierung erzeugte ATP den größten Mengenanteil aus. Für höhere Eukaryonten ist dagegen die oxidative Phosphorylierung entscheidend. Die mengenmäßig um den Faktor ~15 geringere Substratkettenphosphorylierung, bei der aus Verbindungen mit noch höherem Phosphatgruppenübertragungspotential ATP durch direkte Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) synthetisiert wird, ist dagegen für viele weniger komplexe Organismen Hauptenergiequelle und insofern auch evolutionär am ältesten.

Die Vielfalt endergoner Prozesse zeigt sich an den unterschiedlichen „Verbrauchern“ der ATP-Hydrolyse: die Synthese von Biomolekülen, der aktive Stofftransport quer durch Membranen oder durch das Zellinnere, die (makroskopische) Fortbewegung, die Informationsspeicherung und Informationsübermittlung, die Aufrechterhaltung zellulärer und subzellulärer Strukturen. Obwohl ATP in der Zelle die universelle „Energiewährung“ ist, wird es nicht als dauerhafter Energiespeicher genutzt, denn dafür ist der tägliche Umsatz z.B. eines Menschen viel zu groß, da wie erwähnt ein Mensch am Tag annähernd sein eigenes Gewicht an ATP umsetzt. Ein normal arbeitender Muskel benötigt für den Verbrauch seines gesamten Creatinphosphat-Vorrats nur

ungefähr eine Minute, bei intensiver Arbeit sogar nur einige Sekunden. So kann der gesamte Verbrauch des menschlichen Körpers bei extrem starker Belastung kurzfristig auf bis zu 0,5 kg ATP pro Minute ansteigen [1]. Auf Grund dieses hohen Verbrauches muss ATP ständig nachsynthetisiert werden. Deshalb haben sich im Laufe der Evolution effektive Systeme entwickelt, die ATP schnell und in ausreichender Menge bereitstellen können.

Anders als bei der bereits erwähnten Substratkettenphosphorylierung wird ATP bei der Photophosphorylierung bzw. der oxidativen Phosphorylierung direkt aus ADP und Phosphat („P_i“) synthetisiert. Als freie Energiequelle dieser endergonen Reaktion dient in beiden Fällen das elektrochemische Potential eines Ions, in den meisten Fällen des Protons, manchmal auch Na^+. Prinzipiell setzt sich dieses Potential aus zwei Komponenten zusammen, der Konzentrationsdifferenz (ΔpH) zwischen zwei Reaktionsräumen und der damit einhergehenden Ladungsdifferenz (Δψ). Oftmals ist letzteres der entscheidende Faktor, da die reine Konzentrationsdifferenz ausgeglichen, das Potential durch Folgetransportprozesse weiterer Ionen jedoch aufrecht erhalten wird. Das elektrochemische Potential erfordert zwingend zwei voneinander getrennte, aber kommunizierende Reaktionsräume. Dies wird in der Praxis durch eine im Zeitbereich der Reaktionen für das jeweilige „Kopplungsion“ (H^+ oder Na^+) undurchlässige Biomembran realisiert.

Bei der Photosynthese werden durch das Photosystem II und den Cytochrom b_6f-Komplex Protonen ins Thylakoidlumen gepumpt, wodurch die Thyakoidmembran energetisiert wird. In der Atmungskette werden letztlich aus der Nahrungsoxidation entstandenes NADH und $FADH_2$ oxidiert und damit molekularer Sauerstoff zu Wasser reduziert. Im Verlauf des Elektronentransports pumpen dabei die Komplexe I (NADH:Coenzym Q-Oxidoreduktase), III (Coenzym Q:Cytochrom C-Oxidoreduktase) und IV (Cytochrom C Oxidase) Protonen von der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum.

Die Erkenntnis, dass die zur ATP-Synthese aus ADP und P_i erforderliche freie Energie aus einer protonenmotorischen Kraft stammt und der Prozess daher membrangebunden ablaufen muss, stammt von Peter Mitchell („chemiosmotischer Mechanismus“, Mitchell 1961[2], Nobelpreis 1978).

1.2 Die F_OF_1-ATPase aus *Escherichia coli*

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit der ATPase aus *E. coli* gearbeitet wurde, beschränke ich meine Darstellung auf dieses Enzym.

Die *E. coli* ATP-Synthase, auch EF_OF_1 oder *E. coli* F-ATPase genannt, ist aus den acht verschiedenen Untereinheiten a, b, c, α, β, γ, δ, ε aufgebaut (siehe Abbildung 1-3) Die vollständige Summenformel des Komplexes lautet $ab_2c_{10}\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$.

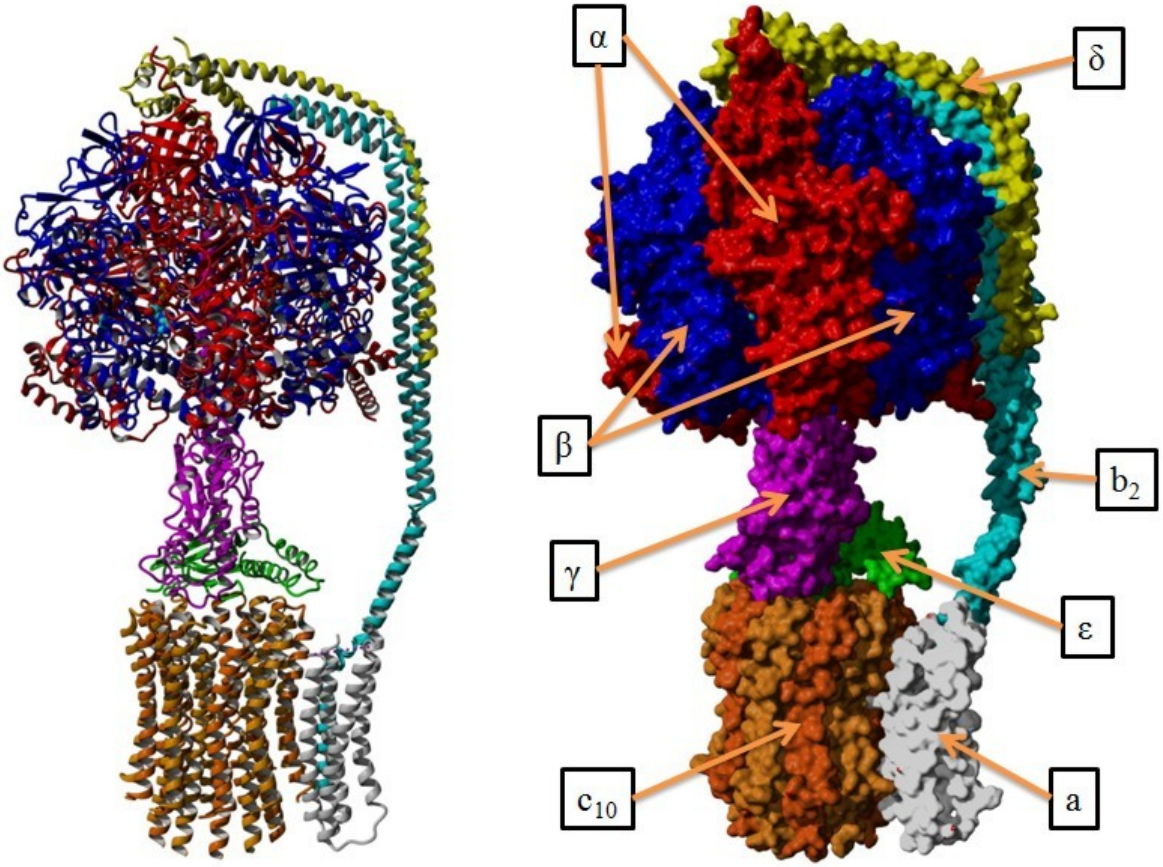


Abbildung 1-3 : Strukturmodell der F_OF_1-ATPase aus *E. coli*

Die gezeigten EF_OF_1-Modelle basieren auf einem hausinternen Homologiemodell (S. Engelbrecht, pers. Mitteilung). Die Abbildung wurde mit dem Programm YASARA[3] erzeugt.

Die Bezeichnung der F-ATPase als F_OF_1 geht auf die historisch gewachsene Einteilung in den membranständigen F_O-Teil, bestehend aus den drei Untereinheiten a, b und c (ab_2c_{10}), und den extrinsischen F_1-Teil $(\alpha\beta)_3\gamma\delta\varepsilon$ zurück. F_O wird auch als Protonentranslokator bezeichnet, F_1 als F-ATPase. Die Synthaseaktivität erfordert eine protonenmotorische Kraft und daher immer das Holoenzym F_OF_1, eingebettet in eine Protonen-undurchlässige Membran, die einen der beiden Reaktionsräume festlegt. Im

Hinblick auf *das* Alleinstellungsmerkmal der ATP-Synthase, nämlich die Anbindung an eine Quelle freier Energie über einen mechanischen (rotatorischen) Zwischenschritt, kann man auch von Rotor- und Statorunterheiten sprechen: erstere sind dann $c_{10}\varepsilon\gamma$, letztere $(\alpha\beta)_3\delta b_2 a$.

Die Aufgaben der Untereinheiten im Einzelnen:

(Die nachfolgende Darstellung orientiert sich an folgenden Publikationen Weber und Senior (2003) und Junge et al (2009)[4,5])

Untereinheit a:

> Besitzt sehr wahrscheinlich zwei Kanäle. Der eine dient zum Transport von Protonen hin zum Aspartatrest 61 in den c-Untereinheiten des c_{10}-Ringes und der andere weg davon. Der Protonenzutritts- und Ausgangskanal müssen gegeneinander versetzt sein.

Untereinheit b:

> Die beiden b-Untereinheiten bilden zusammen mit der δ-Untereinheit die Verbindung zwischen der a-Untereinheit in der Membran und dem $\alpha_3\beta_3$-Hexamer außerhalb der Membran. Sie verhindern das „Mitdrehen“ des Hexamers bei der ATP-Synthese, erlauben aber gleichzeitig eine gewisse Verdrillung und damit die (Zwischen)Speicherung elastischer Energie.

Untereinheit c:

> Die 10 Kopien der c-Untereinheit oligomerisieren in der Membranebene zu einem Ring, der durch transiente Protonierung/Deprotonierung des Restes D61 Protonen über die Kopplungsmembran transportiert.

Untereinheiten α und β:

> Diese beiden Untereinheiten enthalten an ihren (β/α) Schnittstellen die drei katalytisch aktiven Zentren. Die beiden Untereinheiten sind alternierend angeordnet, die reaktiven Zentren werden zum größeren Teil von den drei β-Untereinheiten gebildet. Die drei anderen Schnittstellen (α/β) enthalten passive, vielleicht regulatorische Bindestellen für (während der Katalyse) nicht ausgetauschte Nukleotide.

Untereinheit γ:

> Bildet zusammen mit der ε-Untereinheit die Verbindung zwischen dem c-Ring und dem $\alpha_3\beta_3$-Hexamer und sorgt somit für die Energieübertragung.
> Induziert die Konformationsänderungen des $\alpha_3\beta_3$-Hexamers, welche die ATP-Freisetzung bewirken.

1.3 ATP-Synthese

Aus der vorangehenden Darstellung folgt, dass die an sich stark endergone ATP-Synthesereaktion direkt aus ADP und Phosphat nicht nur eine beschleunigende Katalyse, sondern auch einen „Antrieb“, d.h. eine Quelle freier Energie erfordert, die in geeigneter Weise miteinander gekoppelt sein müssen. Die treibende Kraft der ATP-Synthese ist das Bestreben nach einem Konzentrations- und Ladungsausgleich der beiden, durch die Kopplungsmembran getrennten Reaktionsräume. Da die Kopplungsmembran im Zeitbereich der chemischen Reaktion für Protonen (bzw. Na^+) impermeabel ist, bleibt ihnen nur der Weg über den membranintrinsischen Teil der ATP-Synthase. Nach den gegenwärtig unwidersprochenen und plausiblen Modellen zur Protonentranslokation[6-9] enthält Untereinheit a zwei quer zur Membranebene, gegeneinander versetzte Protonenzutritts- und Protonenausgangskanäle, über die die Protonen zu den Aspartatresten D61 des c-Ringes gelangen können. D61 befindet sich mitten in der Membran. Aus energetischen Gründen ist der Kontakt mehrerer deprotonierter Aspartatreste mit dem hydrophoben Membraninneren verboten. Die Protonentranslokation erfolgt daher über den (wahrscheinlich Wasser-enthaltenden) Zutrittskanal hin zu einem deprotonierten cD61, welches nunmehr, infolge der Protonierung ungeladen, in die Membran eintauchen kann. Dieser Vorgang wiederholt sich schrittweise für alle c-Untereinheiten, bis das betrachtete Proton an den (vermutlich ebenfalls Wasser-enthaltenden) Austrittskanal gelangt. Dort wird die Deprotonierung durch ein passend positioniertes Arginin (aR210) der a-Untereinheit unterstützt (Abbildung 1-4) und das Proton verlässt den F_O-Teil durch den Austrittskanal (Abbildung 1-4).

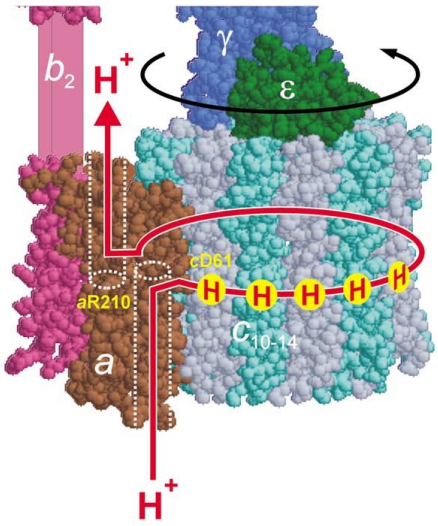


Abbildung 1-4 : Der Transport der Protonen über die Untereinheiten a und c

(Abb. nach Weber und Senior 2003)[4]

Die Rotationsbewegung des protonierten C-Ringes an sich ist thermisch bedingt. Das stochastische Hin- und Zurückdrehen des Ringes in der Membranebene wird durch die geschilderten Protonierungen/Deprotonierungen des c-Ringes in eine gerichtete Rotation übersetzt, da protonierte c-Untereinheiten ($D61^{\pm 0}$) im Moment der Deprotonierung den Kontaktbereich mit der a-Untereinheit ($R210^{+}$) infolge elektrostatischer Abstoßung nicht passieren und unprotonierte c-Untereinheiten ($D61^{-}$) nicht in die Membranebene eintauchen können.

Somit ist das elektrochemische Potential des Protons in eine mechanische Rotation des c-Oligomers umgewandelt worden. Die Rotation des c-Ringes bedingt die Korotation der an c_{10} gebundenen Untereinheiten γ und ε. γ ragt mit seinen zwei antiparallelen und leicht umeinander gewundenen α-Helices (*coiled coil*) in das aus α und β gebildete $(\alpha\beta)_3$-Hexamer hinein. Durch die Rotation der γ-Untereinheit in diesem Hexamer werden zyklische Konformationsänderungen des Hexamers erzwungen, wodurch letztlich ATP freigesetzt wird. Die für die Synthese zuständigen drei katalytischen Zentren mit den Nukleotidbindungsstellen durchlaufen während einer Rotation der γ-Untereinheit gemäß dem „*binding change* Mechanismus“ von Paul Boyer und Mitarbeitern[10] nacheinander die drei folgenden Konformationen:

1. „offen“ (*open*), in der ATP abgegeben wird und ADP bzw. P_i gebunden werden können (Details bzgl. der Reihenfolge sind noch strittig).
2. „fest“ (*tight*), mit sehr hoher Substrataffinität, wobei ADP und Phosphat so eng zueinander positioniert werden, dass es spontan zur Bildung von ATP kommt.
3. „locker“ (*loose*), in der sich die Öffnung langsam schließt (Synthese) oder öffnet (Hydrolyse) und eine geringe Substrataffinität ausgebildet wird. Diese Konformation ist nicht katalytisch aktiv.

Die drei αβ-Paare sind infolge der hexagonalen Struktur mit γ im Zentrum konformationell miteinander gekoppelt, sie nehmen zu einem gegebenen Zeitpunkt niemals dieselbe Konformation ein, sondern durchlaufen diese drei Konformationen stets in derselben Reihenfolge offen – fest – locker (Hydrolyse) oder offen – locker - fest (Synthese). Damit ist die gerichtete Rotation der drei Rotoruntereinheiten in die Freisetzung von spontan gebildetem ATP umgewandelt worden. Pro 360°-Drehung werden insgesamt drei ATP-Moleküle freigesetzt. Die Rotation der γ-Untereinheit verläuft dabei nicht kontinuierlich, sondern in 120°-Schritten, die sich unter Hydrolysebedingungen weiter meßtechnisch in einen ca. 80° und einen ca. 40°-Schritt auflösen lassen, die jeweils mit einer sogenannten Substratbeladungs-Wartephase und

einer katalytischen Phase korrelieren. Die zunächst überraschende Fehlanpassung zwischen Membranrotorteil (c10 ≙ 36°) und extrinsischem Rotoranteil (γε ≙ 120°) erfordert eine elastische Verdrillung, die das Energieprofil des gesamten Prozesses glättet und den Wirkungsgrad verbessert.

Die ATP-Synthase koppelt demnach einen Motor (den c-Ring) an einen Generator (den F_1-Teil). Diese Kopplung ist insofern reversibel, als F_OF_1 durch die Hydrolyse von ATP aktiv Protonen pumpen kann und so eine protonenmotorische Kraft aufbaut. Dabei kehrt sich die Rotationsrichtung erwartungsgemäß um. Von der Membran abgelöstes EF_1 ist weiterhin katalytisch aktiv, allerdings nur hydrolytisch. Infolge der fehlenden Kopplung an den F_O–Teil können keine Protonen gepumpt werden.

1.4 Einfluss der Form der γ-Untereinheit auf die katalyt. Zentren

Die asymmetrisch geformte γ-Untereinheit bedingt (im Ruhezustand) eine bestimmte Konformation von $(\alpha\beta)_3\gamma$, die sich durch die bereits erwähnten leichten Unterschiede bzgl. der drei einzelnen α/β-Paare (offen/fest/locker) auszeichnet. Bei der ATP-Synthese zwingt γ durch seine Rotation die drei katalytischen Zentren nacheinander in diese drei Konformationen., was experimentell durch die mittels Magneten erzwungene unidirektionale Rotation von γ in (über die drei β-Untereinheiten) immobilisiertem F_1 und die daraus resultierende ATP-Synthese gezeigt worden ist [11]. Bei der Hydrolyse von ATP erfolgt die Kraftübertragung umgekehrt vom $(\alpha\beta)_3$-Hexamer auf die γ-Untereinheit, was sich an der unter Hydrolysebedingungen rotierenden γ-Untereinheit in immobilisiertem F_1 mikrovideographisch verfolgen lässt [12]. Daher sind die beiden Betriebsmoden der ATP-Synthase, Protonentranslokation-getriebene ATP-Synthese oder ATP-Hydrolyse-getriebenes Protonenpumpen eindeutig mit einer Rotationsrichtung korreliert. Die Zuordnung selbst muss stereochemische Gründe haben und letztlich auf die Wechselwirkung einer linkshändigen *coiled coil* mit rechtshändigen α-Helices sowie den anderen chiralen Bestandteilen der Schnittfläche zwischen $(\alpha\beta)_3$ und γ zurückgehen. Es fragt sich, ob eine spiegelbildliche γ-Untereinheit („D-γ“ anstelle von „L-γ“) mit der ATPase-Zusammenlagerung und Aktivität kompatibel ist. Abbildung 1-5 zeigt Modelle von L- und D-γ. Da beim D-Enantiomer mitsamt seinem spiegelbildlichen Relief zwei der drei Wechselwirkungsflächen mit dem $(\alpha\beta)_3$-Hexamer die Plätze getauscht haben, ist es denkbar, dass der Einbau erfolgt, die Aktivität erhalten bleibt, die Rotationsrichtung von γ sich jedoch umkehrt (Abbildung 1-6).

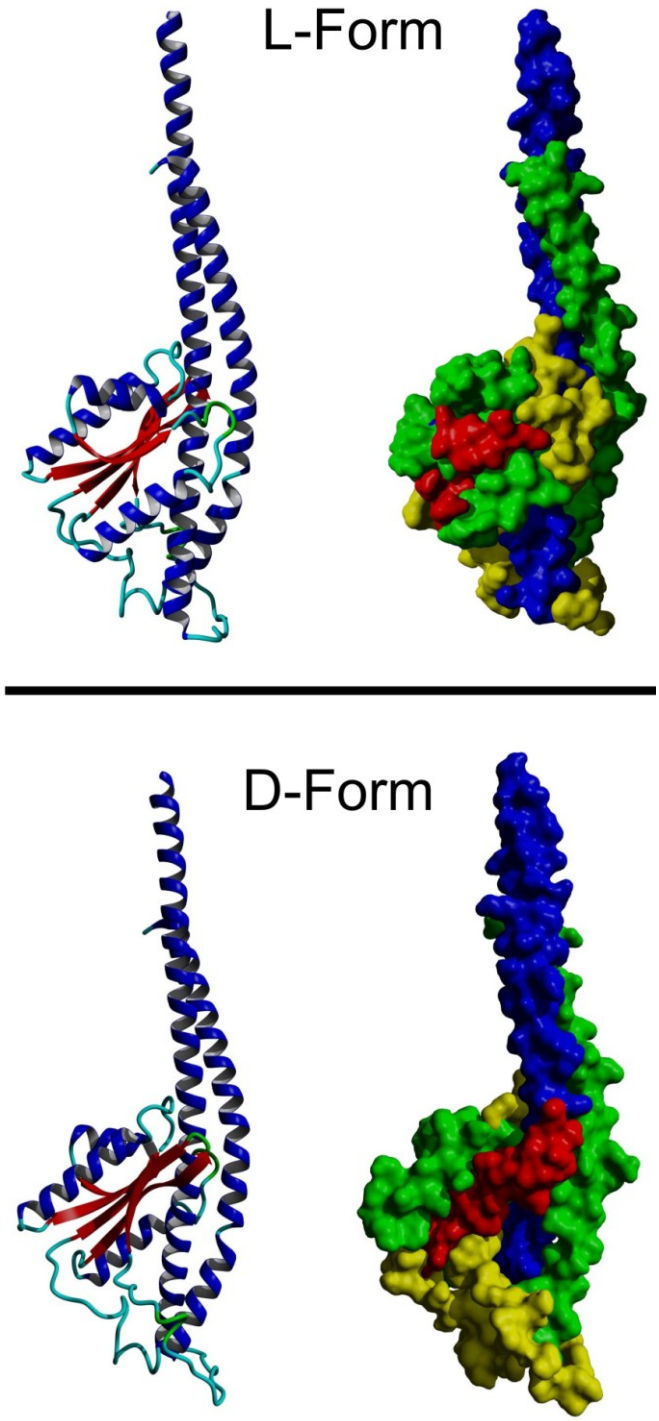
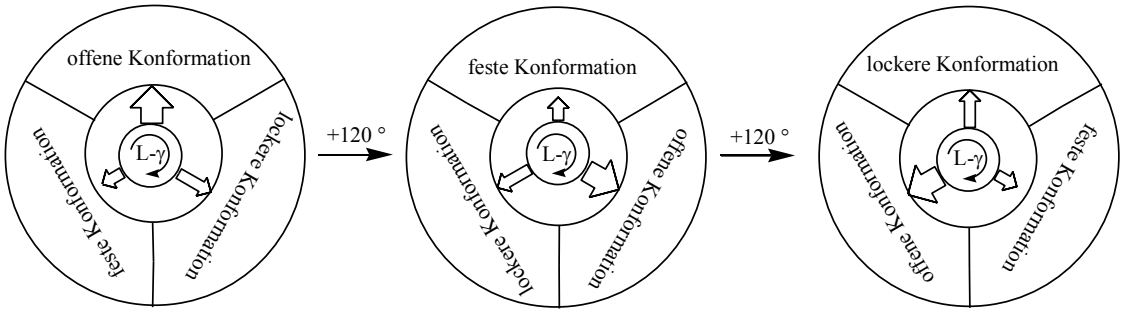


Abbildung 1-5 : Modelle der L- und D-γ-Untereinheit

Die beiden Modelle basieren auf dem Datensatz pdb: 3oaa aus der Duncan-Gruppe[13]. Die Abbildung wurde mit dem Programm YASARA[3] erzeugt. Die Oberflächen der *random coil* Bereiche sind gelb, die der β-Stränge rot und die der α-Helices grün (die N-terminale α-Helix) bzw. blau (die C-terminale α-Helix) eingefärbt.

Rotationsrichtung bei Hydrolyse mit dem nativen L-Enatiomer von γ :



Umgekehrte Rotationsrichtung bei Hydrolyse mit dem D-Enatiomer von γ :

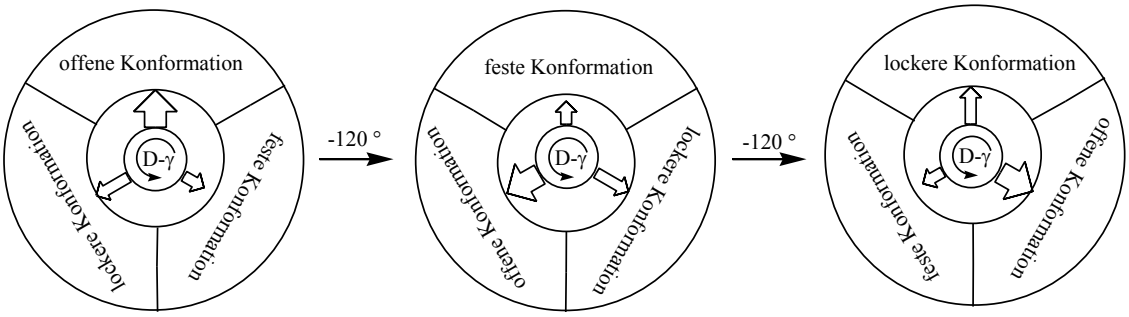


Abbildung 1-6 : Hypothetische Unterschiede in der Rotationsrichtung von L-γ und D-γ bei der Hydrolyse von ATP.

Reihenfolge der Konformationen bei der ATP-Hydrolyse: offen → fest → locker → offen usw. Die drei unterschiedlichen Pfeile für die γ-Untereinheit symbolisieren die drei unterschiedlichen Wechselwirkungen mit dem $(\alpha\beta)_3$-Hexamer. Gezeigt ist die Sicht von oben (Dies entspricht der Sicht beim membrangebundenen EF_OF_1 in Richtung Membran).

Wenn die Reihenfolge der Konformationsänderungen während der ATP-Hydrolyse festgelegt und γ zu diesen Konformationen sterisch komplementär ist, könnte die angedachte Rotationsrichtungsumkehr tatsächlich funktionieren, allerdings nur mit dem Minimalbesatz an für die Hydrolyse erforderlichen Untereinheiten, also $(\alpha\beta)_3\gamma$.

Das γ-D-Enantiomer würde anstelle der proteinogenen L-Aminosäurereste die entsprechenden spiegelbildlichen D-Aminosäurereste enthalten. Da Proteine mit D-Aminosäuren nicht ribosomal synthetisiert werden können, müssen sie totalsynthetisch im Labor hergestellt werden. Die prinzipielle Synthetisierbarkeit mitsamt der erwarteten Auswirkungen auf das Zusammenspiel mit chiralen oder achiralen Substraten wurde bereits mit der erfogreichen Synthese einer D-HIV-Protease gezeigt [14].

1.5 Proteine

Proteine sind neben Polysacchariden und Nukleinsäuren die wichtigsten biologischen Polymere. Sie nehmen aufgrund ihrer Vielfalt eine herausragende Stellung ein. In Organismen erfüllen sie sehr unterschiedliche Funktionen, wie z.B. als

- Strukturproteine
- Bestandteile des Bewegungsapparates (Myosin, Aktin)
- Katalysatoren
- Bestandteile des Immunsystems
- Transportproteine
- Bestandteile des Kommunikationssystems (Kanäle, Hormone)
- Toxine (z.B. Schlangengifte)

Bereits kleine Änderungen der Aminosäuresequenz oder post-translationale Modifikationen können die Funktion eines Proteins ändern oder ganz verhindern und so u. U. Krankheiten auslösen. Für die Erforschung von Krankheitsursachen, zur Aufklärung von Wirkungsmechanismen, zur Herstellung von Medikamenten oder auch neuartiger Enzyme ist es erforderlich, Proteine gezielt modifizieren und synthetisieren zu können.

Nach der Anzahl der Aminosäurereste werden die Polymere von Aminosäuren grob in Proteine (mehr als 100 Reste), (Poly-)Peptide (10-100 Reste) und Oligopeptide (2-9 Reste) eingeteilt. Die Grenzen sind willkürlich und nicht durch biochemische Eigenschaften bestimmt. Alle proteinogenen Aminosäuren sind mit Ausnahme von Glycin chiral mit einer L-Konfiguration nach der Nomenklatur von Fischer. Am chiralen C_α-Kohlenstoffatom sind neben der namengebenden Amino- und Carboxygruppe ein Wasserstoff und eine sogenannte Seitenkette gebunden. Die einzelnen Aminosäuren unterscheiden sich durch diese Seitenkette, die polar oder apolar, aliphatisch oder aromatisch, geladen oder ungeladen sein kann. Proteine, die aus L-Aminosäuren aufgebaut sind, haben entsprechend auch eine L-Konfiguration, was sich z. B. auf der Sekundärstrukturebene in rechtsgängigen α-Helices niederschlägt. Im Protein bzw. Peptid sind die einzelnen Aminosäurereste über eine Amidbindung miteinander verknüpft, die allgemein Peptidbindung genannt wird.

1.6 Peptidsynthesen

Zur Darstellung von Proteinen kommen die Isolation aus natürlichen Quellen oder die chemische Totalsynthese in Frage. Erstere kann durch Präparation unter Ausnutzung der natürlichen Quelle des jeweiligen Proteins erfolgen, oder man macht sich die Proteinbiosynthese zunutze, exprimiert das Protein heterolog und lässt die Synthese z.B. durch Mikroorganismen ribosomal durchführen. Dazu schleust man das Gen für das gewünschte Protein in einen Wirtsorganismus ein, der in der Regel gut kultivierbar und mit modernen gentechnologischen Verfahren leicht manipulierbar sein sollte. Dafür kommen Organismen wie Hefen, Bakterien sowie virusinfizierte Zellen in Betracht. Auf diese Weise lassen sich schnell und relativ unkompliziert große Mengen an Proteinen produzieren.

Diese Methode hat aber folgende Einschränkungen:

- Es lassen sich nur mit größerem Aufwand unnatürliche Aminosäuren (über entsprechend modifizierte tRNA) in die Sequenz einbauen, manche Aminosäuren überhaupt nicht
- Das exprimierte Protein darf nicht toxisch für den Wirtsorganismus sein
- Der Wirtsorganismus darf das Protein nicht als fremd erkennen und sofort wieder abbauen
- Der Wirtsorganismus darf das Protein nicht unkontrolliert modifizieren
- Das Protein darf für seine Faltung nicht auf ein Chaperon angewiesen sein (das Faltungsproblem tritt allerdings auch bei chemisch synthetisierten Proteinen auf)

Falls das gewünschte Protein nicht biosynthetisch hergestellt werden kann, weil es inkompatibel mit den vorhandenen Expressionssystemen ist oder weil es an einer speziellen Stelle modifiziert sein soll, bleibt für die Herstellung nur die chemische Synthese.

Dafür stehen zwei verschiedene Methoden zur Auswahl, einmal die Flüssigphasensynthese, zum anderen die Festphasensynthese. Die ältere der beiden Methoden, die Flüssigphasensynthese, erlaubte bereits die Synthese von kleineren Peptiden. Ein Beispiel ist das von Vigneaud[15] 1953 synthetisierte Oxytocin (bestehend aus 9 Aminosäureresten). Ein Nachteil dieser Methode liegt darin, dass nach jeder durchgeführten Kopplung die gesamte Reaktionsmischung gereinigt werden muss, da nicht reagierte Aminosäuren vor der nächsten Kopplung abgetrennt werden müssen.

Zudem werden die Syntheseprodukte u. U. in der Flüssigphase von Kopplung zu Kopplung immer unlöslicher, sodass sie vorzeitig aus der Reaktionslösung ausfallen und dann die Synthese unvollständig abläuft.

Diese Probleme wurden durch die Entwicklung der Festphasensynthese (Solid-phase peptide synthesis, SPPS) durch Merrifield[16] im Jahre 1963 gelöst. Dabei ist die wachsende Peptidkette über eine spaltbare Verbindung an ein Harzmolekül gebunden. Durch diese Immobilisierung ist es somit möglich, das Syntheseprodukt nach erfolgreicher Kopplung von den anderen Bestandteilen der Reaktionsmischung durch einfaches Filtrieren und anschließendes Spülen zu reinigen. Somit muss das Reaktionsprodukt lediglich am Ende der Synthese und nach Abspaltung vom Harz durch eine Chromatographie gereinigt werden, was einen enormen Zeitvorteil mit sich bringt (Abbildung 1-7 zeigt das Flussdiagram einer solchen Synthese).

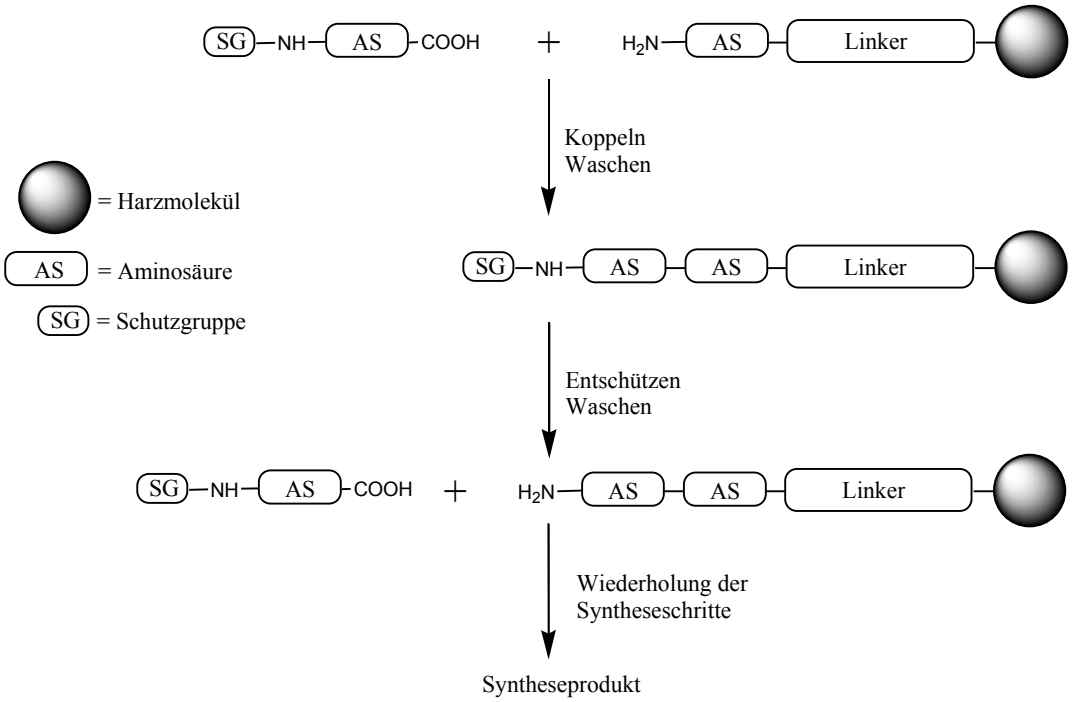


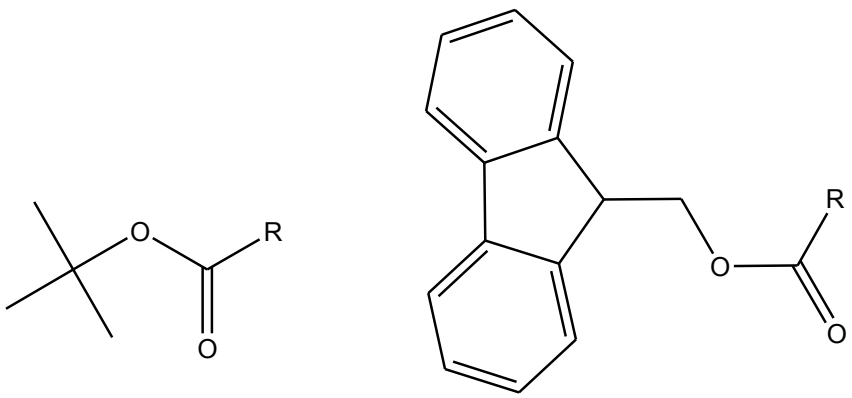
Abbildung 1-7 : Flussdiagram einer Festphasensynthese

Durch den Wegfall der Aufreinigungen zwischen den Kopplungen bietet sich zudem die Möglichkeit, die Synthese zu automatisieren und durch einen Syntheseroboter durchführen zu lassen. Aufgrund der hohen Kosten für die benötigten Syntheseharze wird die industrielle Massenproduktion von kleinen Peptiden jedoch trotz der Reinigungsproblematik häufig weiterhin über eine Flüssigphasensynthese realisiert.

Beide Peptid-Synthese-Methoden setzen voraus:

- möglichst quantitative Kopplungsausbeuten (>99,5 %), da sonst durch die Bildung zu vieler Nebenprodukte nur kleine Peptide wirtschaftlich synthetisiert werden können
- Kopplung der Aminosäuren ohne Razemisierung des Produktes
- die Verwendung temporärer Schutzgruppen für die Aminofunktion der zu koppelnden Aminosäuren, die sonst auch mit sich selbst reagieren würden
- die Verwendung von permanenten Schutzgruppen für die Seitenkettenfunktionen (Amino-, Carboxy-, Sulfhydryl-) einiger Aminosäuren zur Verhinderung von Nebenreaktionen
- orthogonale Abspaltungsbedingungen der permanenten und temporären Schutzgruppen, d.h. die permanenten Schutzgruppen müssen unter den Abspaltungsbedingungen der temporären Schutzgruppen stabil sein.

Für das temporäre Schützen der Aminofunktionen von Aminosäuren werden am häufigsten die Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc) und die tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc) verwendet. Diese Schutzgruppen sind in Abbildung 1-8 abgebildet.



tert-Butyloxycarbonyl (Boc) Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)

Abbildung 1-8 : Temporäre Schutzgruppen

Die Fmoc-Schutzgruppe ist im Gegensatz zu vielen anderen Schutzgruppen im Sauren stabil und kann durch Einwirkung einer Base abgespalten werden. Die Abspaltung erfolgt in der Regel mit 10 % Piperidin in Dimethylformamid (DMF). Die Boc-Schutzgruppe wird nicht durch eine Base abgespalten, sondern nur durch eine starke Säure, in der Regel Trifluoressigsäure (TFA). In Abbildung 1-9 sind die Unterschiede im Abspaltungsmechanismus dargestellt.

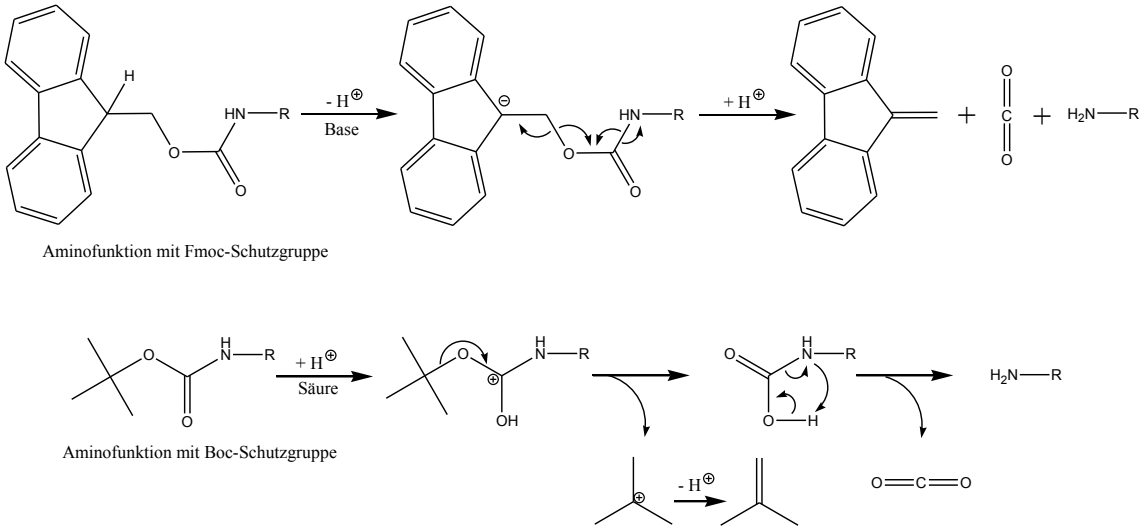
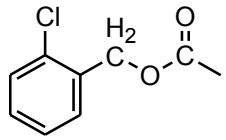
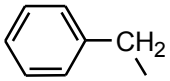
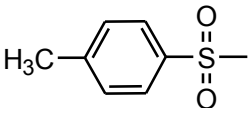
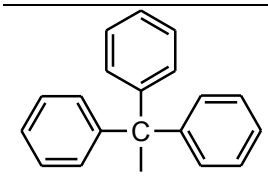
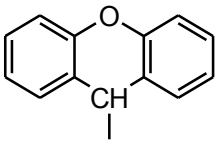


Abbildung 1-9 : Abspaltung-Mechanismen der Schutzgruppen Boc und Fmoc.

Der Erfolg der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe lässt sich im Gegensatz zur Boc-Schutzgruppe durch die Abnahme der UV-Absorption bei 301 nm, die durch den aromatischen Teil der Schutzgruppe hervorgerufen wird, in der Waschlösung nachweisen. Dieser Nachweis wird in Syntheserobotern genutzt, um den Erfolg des Entschützens zu überprüfen und um sicherzustellen, dass das Syntheseharz nach dem Entschützen ausreichend gespült wurde. Dies und die milderen Abspaltungsbedingungen für die Fmoc- im Vergleich zur Boc-Schutzgruppe sind die Hauptgründe für die verbreitete Verwendung von Fmoc durch Syntheseroboter.

Für das permanente Schützen der Seitenkettenfunktionen sind eine Reihe von verschiedenen Schutzgruppen entwickelt worden. In Tabelle 1.1 sind fünf davon aufgeführt. Die Abspaltungsbedingungen dieser Schutzgruppen müssen orthogonal zu den Abspaltungsbedingungen der temporären Schutzgruppen sein. So müssen die Schutzgruppen bei einer Fmoc-Synthese stabil gegen Basen sein und frühestens beim Abspalten des Produktes vom Harz entfernt werden. Bei einer Boc-Synthese müssen die Schutzgruppen stabil gegen TFA sein und ebenfalls frühestens bei der Abspaltung des Produktes entfernt werden.

Tabelle 1.1 : Permanente Schutzgruppen

Schutzgruppe	*Name*	*Abkürzung*	*Schützt*	*Abspaltung durch*
	2-Chlorobenzylcarbonyl	2 Cl-Z	-NH_2	HF, TFMSA
	Benzyl	Bzl	-SH -OH	HF, TFMSA
	Tosyl	Tos	-NH_2	HF, TFMSA
	Trityl	Trt	-NH_2 -SH	TFA
	Xanthyl	Xan	-NH_2	TFA

Die Abspaltung des Syntheseproduktes vom Harz und meist die Entfernung der permanenten Schutzgruppen erfolgt bei einer Fmoc-Synthese durch die Einwirkung von Trifluoressigsäure (TFA). Da bei der Boc-Synthese TFA zum Entfernen der Boc-Schutzgruppe benötigt wird, muss bei einer Boc-Synthese eine TFA-resistente Verbindung mit dem Harz verwendet werden, da sonst das Produkt beim ersten Entschützen bereits abgespalten würde. Die bei der Boc-Synthese verwendeten Verknüpfungen sind deshalb so säurestabil, dass das Syntheseprodukt erst durch Einwirken einer deutlich stärkeren Säure, wie z.B. Fluorwasserstoff (HF), abgespalten wird. Die Verwendung von flüssigem HF ist nicht ungefährlich und benötigt deshalb eine spezielle Abspaltungsapparatur, die inert gegen HF ist und ein ungefährliches Arbeiten erlaubt. Bei der Abspaltung des Produktes mit HF erfolgt in der Regel auch die Entfernung der permanenten Schutzgruppen. Eine Abspaltung vom Harz wäre natürlich auch mit anderen sehr starken Säuren wie z.B. Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) oder Trimethylsilyltrifluormethansulfonsäure (TMSOTf) möglich, aber diese Säuren

entfernen nicht alle permanenten Schutzgruppen und sie lassen sich nicht so leicht wie HF aus dem Abspaltungsgemisch entfernen.

Die Wahl der für die Synthese zu verwendenden Schutzgruppe (Fmoc oder Boc) richtet sich auch nach den Eigenschaften des zu synthetisierenden Peptides. Falls sich in dem gewünschten Syntheseprodukt basisch labile Gruppen wie z.B. Thioester befinden, würde man für die Synthese die Boc-Schutzgruppe verwenden. Fmoc wäre dagegen vorzuziehen, wenn sich im Syntheseprodukt säurelabile Modifikationen wie bei Glykoproteinen befinden. Für eine Boc-Synthese ist außerdem eine HF-Abspaltungsanlage unerlässlich.

Nach erfolgreicher Abspaltung erfolgt die Reinigung des Syntheseproduktes in der Regel mit Hilfe einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).

1.7 Peptidligation

Bei einer Peptidsynthese sind die maximalen praktikablen Längen der zu synthetisierenden Peptide ca. 50-60 Aminosäurereste. Die Längenbegrenzung ergibt sich aus der nicht quantitativen Effizienz der Aminosäure-Kopplung, die zur Akkumulation von Nebenprodukten während der Synthese führt. In Tabelle 1.2 sind die errechneten prozentualen Produktausbeuten theoretischer Peptidsynthesen in Abhängigkeit von der Kopplungseffizienz und der Kopplungsanzahl angeben. Es ist ersichtlich, dass für die Synthese von Peptiden mit 50 oder mehr Resten eine Kopplungseffizienz von mindestens 99 % benötigt wird, um die Synthese wirtschaftlich durchführen zu können.

Tabelle 1.2 : Produktausbeuten in Abhängigkeit von Kopplungseffizienz und Kopplungszahl

	Kopplungen					
	1	10	25	50	75	100
Kopplungs-Effizienz [%]	Produktausbeute [%]					
50,00	50,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
70,00	70,0	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0
90,00	90,0	34,9	7,2	0,5	0,0	0,0
95,00	95,0	59,9	27,7	7,7	2,1	0,6
98,00	98,0	81,7	60,3	36,4	22,0	13,3
99,00	99,0	90,4	77,8	60,5	47,1	36,6
99,50	99,5	95,1	88,2	77,8	68,7	60,6

Diese einfache Berechnung geht davon aus, dass die Kopplungseffizienz von allen verwendeten Aminosäuren diesen Wert erreicht und nicht von der Kettenlänge des wachsenden Peptides abhängig ist. Tatsächlich ist jedoch die Kopplungseffizienz der Aminosäuren unterschiedlich und mit wachsender Peptidkette nimmt sie darüber hinaus aufgrund von sterischen Wechselwirkungen ab[17]. Somit liegen die tatsächlichen Produktausbeuten unterhalb des errechneten Wertes. Die tatsächlichen Produktausbeuten sind nur experimentell bestimmbar. Innerhalb gewisser Grenzen lassen sie sich möglicherweise durch Modifikationen der Kopplungsbedingungen wie z.B. der Durchführung von Doppelkopplungen oder der Verlängerung der Kopplungsdauer erhöhen.

Auf Grund dieser Längenbegrenzung synthetischer Peptide auf ca. 50-60 Reste muss man bei der Vollsynthese größerer Proteine zunächst kleinere Peptide synthetisieren und diese dann zum vollständigen Protein verknüpfen. Falls nur kleine Bereiche im Zielprotein, z.B. an den Termini, verändert werden sollen, bietet sich eine Kombination der ribosomalen Proteinbiosynthese mit der chemischen Synthese an. Dabei würde man den nicht modifizierten Teil des Proteins biosynthetisch herstellen und ihn dann mit dem synthetischen und modifizierten Teil verbinden.

Für das Verknüpfen von Peptiden sind eine Reihe von Verfahren entwickelt worden, die oftmals jedoch nicht zur Ausbildung einer echten Peptidbindung führen. Die derzeit erfolgreichste Methode zur Ausbildung einer nativen Peptidbindung zwischen zwei Peptiden ist die sogenannte native chemische Ligation (NCL). Das Reaktionsprinzip dieser Reaktion ist schon seit den 50er Jahren bekannt [18], wurde aber erst in der 90er Jahren zur Verknüpfung von Peptiden eingesetzt[19].

Bei der nativen chemischen Ligation [19] reagiert ein C-terminaler Peptid-Thioester unter Ausbildung einer Peptidbindung mit dem N-terminalen Cystein des zweiten Peptides. Diese Reaktion ist so spezifisch, dass die Seitenketten der Peptide nicht geschützt sein müssen, was ihre Löslichkeit deutlich verbessert und so die Methode auch für größere Proteine anwendbar macht. In Abbildung 1-10 ist der Reaktionsmechanismus dargestellt. Details des Reaktionsverlaufes werden im Methodenteil besprochen.

Diese Art der Ligation erfordert zwingend ein N-terminales Cystein in einem der beiden Edukte. Zum Sequenzerhalt des zu synthetisierenden Proteins sollten folglich schon die in der Aminosäuresequenz vorhandenen Cysteinreste bei der Ligation verwendet werden. Falls das nicht geht, bleibt häufig nur das Einführen „neuer“ Cysteine an geeigneter Position in der Sequenz, wobei zu prüfen bleibt, inwieweit diese Cysteine einen Einfluss auf die Struktur oder die Aktivität des synthetischen Proteins haben.

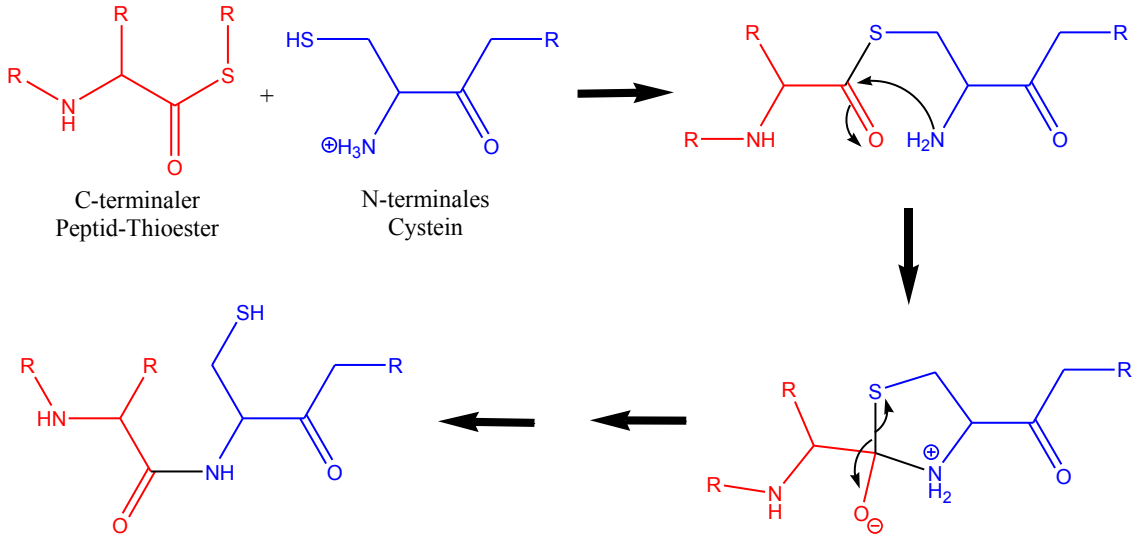


Abbildung 1-10: Native chemische Ligation

Cysteine können durch Desulfurierung in Alanine überführt werden. Daher könnte man auch für die Ligation ein Alanin in der Ausgangssequenz durch ein Cystein ersetzen, die Ligation durchführen und dann schließlich das Cystein durch eine Desulfurierung in ein Alanin zurück überführen. Dies würde erfordern, dass in der Aminosäuresequenz an sich vorhandene (aber unpassend positionierte) Cysteinreste während der Reaktion durch Schutzgruppen geschützt sind, da sie sonst auch in Alanine umgewandelt würden.

Desweiteren besteht die Möglichkeit, entsprechende Aminosäurederivate einzusetzen, die die räumliche Anordnung der Aminofunktion und der Thiolgruppe eines Cysteins nachahmen. Dabei kann die Seitenkette modifiziert werden [20] (Siehe Abbildung 1-11) oder es kann an die Aminofunktion des N-terminalen Restes eine Hilfsgruppe [21] gekoppelt werden (Abbildung 1-12). Auf diese Weise können derart modifizierte Aminosäurereste auch in einer Ligationsreaktion eingesetzt werden. Dabei kommt es analog der Ligation mit einem Cystein zu dem üblichen ringförmigen Übergangszustand und dann zur Ausbildung der Peptidbindung. Nach Erfolg der Ligation können die modifizierten Aminosäurereste wieder in ihre natürliche Form, entweder durch eine Desulfurierung (modifizierte Seitenkette) oder durch saure Hydrolyse (Hilfsgruppe) überführt werden. Auf diese Weise erreicht man ebenfalls eine „spurlose“ Ligation.

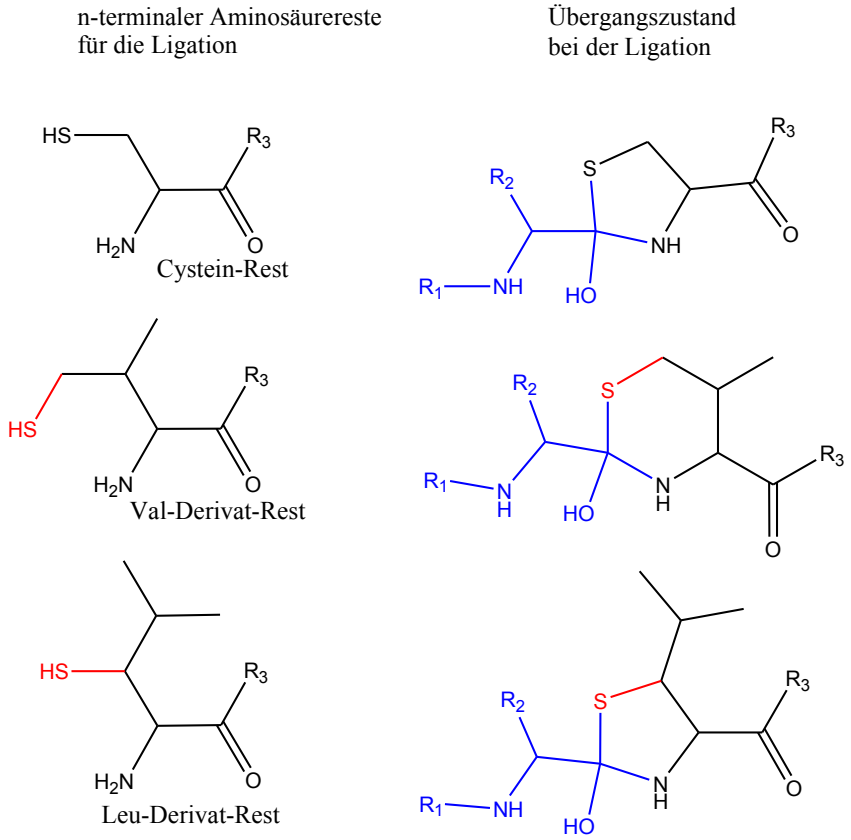


Abbildung 1-11 : Aminosäurederivate für Ligationen ohne Cystein

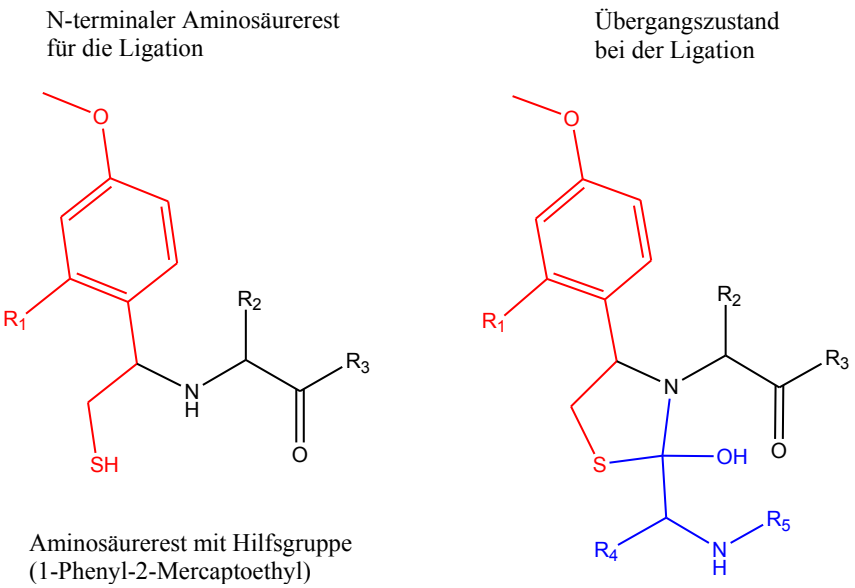


Abbildung 1-12 : Verwendung einer temporären Hilfsgruppe bei einer Ligation ohne Cystein

Die Einführung des terminalen Thioesters ist im Vergleich zu den notwendigen Cysteinen unproblematisch, da der Thioester im Verlauf der Ligation abgespalten wird und so keine Spuren im Syntheseprodukt hinterlässt. Eingeführt wird der Thioester direkt während der Boc-Synthese durch Kopplung analog der einer Aminosäure.

Bei der Ligation großer Proteine aus mehreren kleineren Peptiden gibt es prinzipiell zwei mögliche Reihenfolgen, mit denen die Peptide zum vollständigen Protein zusammengefügt werden können. Die eine Methode ist die sequenzielle Ligation [19,22], bei der die einzelnen Peptide nacheinander, beginnend mit dem C-terminalen Peptid, zusammengefügt werden. Die andere Methode ist die konvergente Ligation [23,24], bei der zunächst zwei Hälften des gewünschten Produktes getrennt ligiert werden, bevor sie schließlich zum Endprodukt verbunden werden.

Die sequenzielle Ligation ist in Abbildung 1-13 schematisiert.

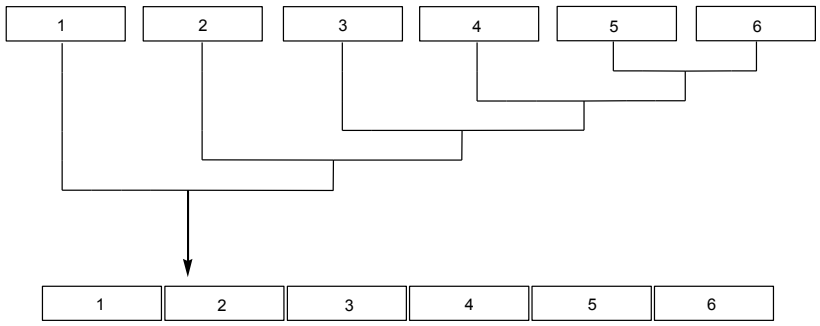


Abbildung 1-13 : Sequenzielle Ligation

Ein Problem der sequentiellen Ligation liegt in dem von Schritt zu Schritt stetig länger werdenden Protein. Die Ligationseffizienz kann von der Länge der zu ligierenden Edukte abhängen: Je länger es ist, umso größer die Wahrscheinlichkeit, dass die Ligationsstelle sterisch durch das Edukt selbst abgeschirmt wird und somit nicht vollständig abreagiert. Dies könnte einer der Hauptgründe für die stark fallenden Ligationsausbeuten von Ligation zu Ligation bei der Synthese größerer Proteine sein. Diesem Problem kann u. U. durch die konvergente Ligationsstrategie begegnet werden, da dabei zunächst zwei Hälften des Zielproteins ligiert und erst zuletzt zum vollständigen Produkt verbunden werden (Abbildung 1-14).

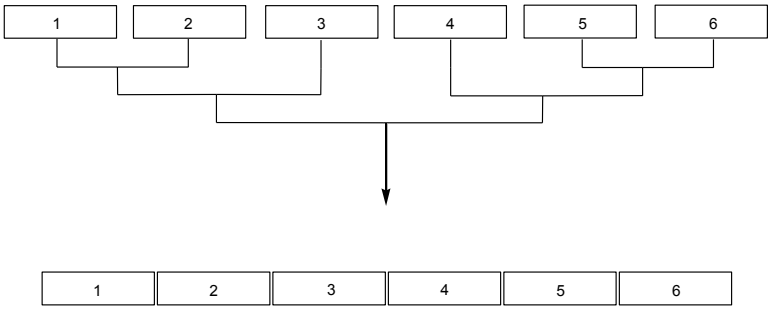


Abbildung 1-14 : Konvergente Ligation

Abgesehen von der letzten Ligation sind bei dieser Vorgehensweise die verwendeten Peptide kürzer, somit könnte die Ausbeute des Volllängenproteins insgesamt größer ausfallen. Allerdings ergibt sich hier die Schwierigkeit, dass man für die finale Ligation der beiden Hälften ebenfalls einen Thioester am C-Terminus von Peptid 1-3 (Abbildung 1-10) benötigt. Da man diesen Thioester nicht nachträglich koppeln kann, müssen bei der Ligation zwei Peptide miteinander reagieren, die zwar beide jeweils einen Thioester besitzen, von denen aber nur der eine unter den gewählten Bedingungen reagieren darf (Abbildung 1-15). Um Nebenprodukte zu verhindern, muss eine solche Ligation deshalb kinetisch kontrolliert sein. Dies wird durch die Verwendung von unterschiedlichen Thioestern realisiert.

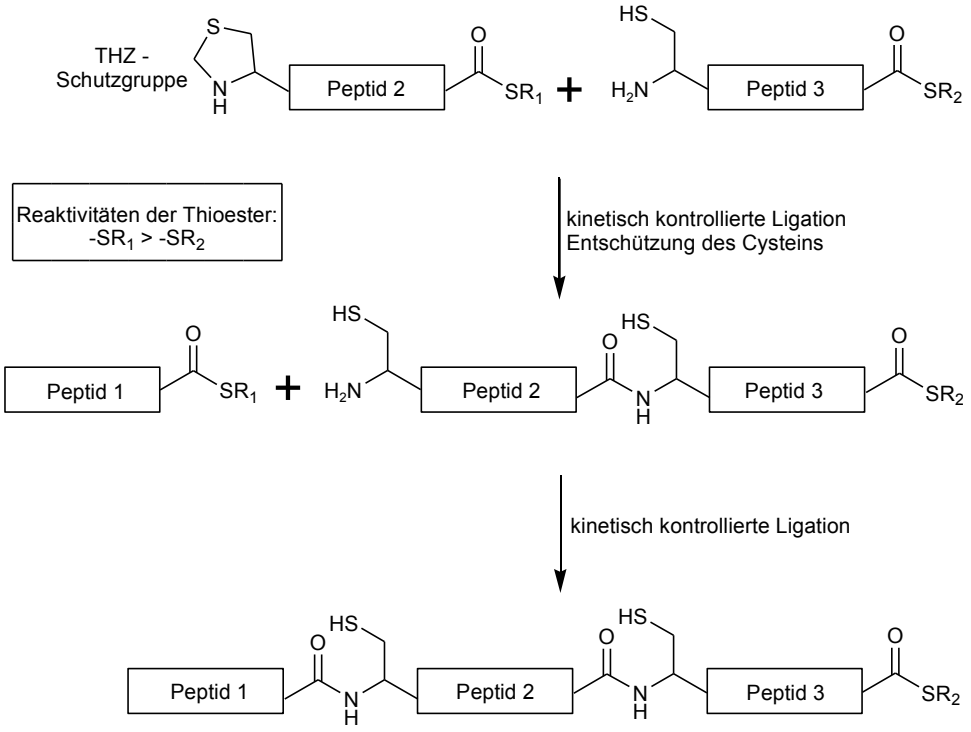


Abbildung 1-15 : Zweistufige kinetisch kontrollierte Ligation

Die Reaktivität der Thioester hängt direkt von der Säurestärke der Thiol-Abgangsgruppe ab. So ist die Säurestärke eines Arylthioesters größer als die eines Alkylthioesters. Daher sind erstere reaktiver und ligieren deutlich schneller [24]. Bei der kinetisch kontrollierten Ligation dürfen keine Thiole wie 4-Mercaptophenylessigsäure (MPAA) zugesetzt werden, da sie den Unterschied in der Reaktivität durch eine Umesterung egalisieren würden.

Bei einer zweistufigen kinetisch kontrollierten Ligation muss zudem eines der Cysteine der Peptide geschützt sein, um die Bildung des falschen Produktes zu verhindern (Abbildung 1-15). Bei der Wahl der Schutzgruppe für das Cystein muss dabei darauf geachtet werden, dass unter den Reaktionsbedingungen zum Entschützen dieses Cysteins der später noch benötigte Thioester nicht hydrolysiert wird.

Bei beiden Ligationsmethoden (sequentiell und konvergent) ergibt sich bei einer quantitativ durchgeführten Ligation die Möglichkeit, die nächste Ligation ohne Aufreinigung des Ligationsansatzes durchzuführen. Der Vorteil einer solchen *one-pot*-Ligation [22] liegt in der Einsparung der Chromatographie zwischen den Ligationen und der damit einhergehenden Verluste durch die Chromatographie.

Mit Hilfe dieser Ligationsmethoden ist es möglich geworden, die Längenbegrenzung der Proteinsynthese deutlich nach oben zu verschieben.

Beispiele sind die Synthesen von:

- HIV-Protease, D-Form, 203 Reste, (1992) [14]
- HIV-Protease, L-Form, 203 Reste (1995 und 2007) [25,26]
- Humaninsulin, 130 Reste (2007) [27]
- Tetraubiquitin, 4 x 76 Reste (2011) [28]
- Erythropoetin, 166 Reste (2012) [29]
- *E. coli*-F_1-γ, 286 Reste (2012) *diese Dissertation*

2 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollen die Rahmenbedingungen für ein späteres Experiment geschaffen werden, das auf die Funktionalität des D-Enantiomers der γ-Untereinheit der ATP-Synthase abzielt. Da die spiegelbildliche γ-Untereinheit nur durch chemische Synthese dargestellt werden kann, soll zunächst eine Syntheseroute entwickelt und experimentell überprüft werden. Der Ansatz ist infolge der Größe des Proteins nicht trivial.

Die erfolgreiche Synthese erfordert neben der chemischen Analytik zusätzlich den Nachweis des Erhalts der biologischen Kompatibilität, dies auch deshalb, weil die Synthese unter ausschließlich denaturierenden Bedingungen erfolgt und daher das Endprodukt *in vitro* gefaltet werden muss. Zu diesem Zweck soll die Rekonstitution des Rumpf-EF_1, bestehend aus dem katalytisch aktiven Minimalbesatz an Untereinheiten, etabliert werden.

Da eine möglicherweise erfolglose Rekonstitution mit spiegelbildlichem γ keine eindeutige Aussage darüber zulassen würde, ob die Totalsynthese kein biologisch aktives γ liefert oder ob die Rekonstitution aufgrund der Strukturänderung nicht mehr möglich ist, soll als Kontrolle zunächst das natürliche L-Enantiomer synthetisiert werden. Die Erfahrungen aus dieser Kontroll-Synthese können dann die Grundlage für die spätere Synthese einer spiegelbildlichen γ-Untereinheit bilden. Die Totalsynthese erfordert die Abänderung der Aminosäuresequenz bei mehreren Resten. Die Funktionalität einer derart modifizierten γ-Untereinheit soll im Vorfeld durch Punktmutagenesen überprüft werden.

Die notwendigen Versuche teilen sich in fünf Blöcke:

1. Präparation der Untereinheiten α, β und γ aus nativem EF_1
2. Rekonstitution von Rumpf-EF_1 aus diesen drei Untereinheiten
3. Einführung von Punktmutationen in γ, Überprüfung ihrer Auswirkungen
4. Chemische Totalsynthese der γ-Untereinheit
5. Rekonstitution von Rumpf-EF_1 unter Verwendung des synthetischen γ

Dabei ist jeder nachfolgende Block von den vorherigen Blöcken abhängig, sodass die Versuchsblöcke nur in der angegebenen Reihenfolge durchgeführt werden können.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese der γ-Untereinheit

3.1.1 Synthese der Peptide

3.1.1.1 Synthesestrategie

Untereinheit γ der ATP-Synthase aus *Escherichia coli* enthält 286 Reste. Da ein Protein solcher Größe nicht in einem Stück synthetisiert werden kann, wurde es in sechs etwa gleich große Peptide aufgeteilt, die später zum vollständigen Protein ligiert werden mussten.

Bei der Syntheseplanung mussten verschiedene Gegebenheiten der späteren Ligation beachtet werden. Die native chemische Ligation, die zur Ausbildung von Peptidbindungen führt, die mit den ribosomal gebildeten Bindungen identisch sind, erfordert am C-Terminus der Peptide 1-5 einen Thioester und am N-Terminus der Peptide 2-6 ein Cystein. Einzelheiten finden sich im Methodenteil in Kapitel 5.7, Seite 124. Die derart festgelegten Peptide sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: zu synthetisierende Peptide und ihre Sequenzen

Peptid	*Reste*	*Sequenz*
Peptid 1 γ(1-58)-XA	58 (60)	AGAKDIRSKIASVQNTQKITKAMEMVAASKMRKSQDRMAASRPYAETMRKV IGHLAHG**XA**
Peptid 2 γ(Thz^{59}-107)-XA	49 (51)	ZLEYKHPYLEDRDVKRVGYLVVSTDRGLAGGLNINLFKKLLAEMKTWTA**XA**
Peptid 3 γ(Thz^{108}-145)-XRRRRA	38 (44)	ZGVQADLAMIGSKGVSFFNSVGGNVVAQVTGMGDNPSL**XRRRRA**
Peptid 4 γ(Thz^{146}-192)-XA	47 (49)	ZELIGPVKVMLQAYDEGRLDKLYIVSNKFINTMSQVPTISQLLPLPA**XA**
Peptid 5 γ(Thz^{193}-236)-XA	44 (46)	ZDDDDLKHKSWDYLYEPDPKALLDTLLRRYVESQVYQGVVENLA**XA**
Peptid 6 γ(Cys^{237}-286)	50	CEQAARMVAMKAATDNGGSLIKELQLVYNKARQASITQELTEIVSGAAAA

Das Z in der Sequenz steht für das als 1,3-Thiazolidin eingeführte Cystein. Das X in der Sequenz steht für den Thioester (S-Trityl-ß-Mercaptopropionsäure). Die fett geschriebenen Buchstaben in den Sequenzen kennzeichnen den Thioester mitsamt weiterer, über Peptidbindung gebundener C-terminaler Aminosäurereste. Die in Klammern gesetzte Zahl steht für die Zahl der gesamten Kopplungen an den Pam-Linker (inklusive Ala-Thioester und 4x Arginin-tag)

Da das aus diesen sechs Peptiden ligierte Volllängen-γ aus den oben dargelegten Gründen vier neue Cysteine (γ(N60C), γ(S146C), γ(S193C), γ(S237C)) enthalten würde, musste untersucht werden, ob die zusätzlichen Cysteinreste mit der biologischen Funktion der γ-Untereinheit vereinbar sind. Dazu wurden die für die spätere Ligation erforderlichen Cysteinreste durch Punktmutationen in die γ-Untereinheit eingeführt und die spezifische Aktivität eines EF_1 mit dieser cysteinhaltigen γ-Untereinheit gemessen. Die so gemessene ATPase-Aktivität war identisch mit der Aktivität des Wildtyp-Enzyms (~100 U/mg).

Für die Untersuchung der Rotation wird das in der Ursprungssequenz der γ-Untereinheit (pKH7) vorhandene Cystein C108 benötigt. Wenn weitere Cysteine eingefügt werden, musste geklärt werden, ob diese mit der mikrovideographischen Rotationsmessung vereinbar waren. In einem Vergleichsexperiment war kein Unterschied feststellbar.

Ansätze zur Vermeidung nicht in der Originalsequenz enthaltener Cysteinreste im Ligationsprodukt (Kapitel 1.7) wurden im Zuge dieser Arbeit nicht verfolgt, da

- die eingeführten Cysteine die biologische Aktivität nicht beeinträchtigten
- die Entfernung der Modifikationen eine weitere Umsetzung des finalen Ligationsproduktes erfordert hätte, was zu weiteren Ausbeuteverlusten geführt hätte
- diese Verfahren noch nicht so gut etabliert sind und auf die speziellen Bedingungen einer jeden Ligation hätten angepasst werden müssen.

3.1.1.2 Durchführung

Die Synthese wurde mittels Boc-Chemie durchgeführt, da mit dieser Methode größere und hydrophobere Peptide synthetisiert werden können, als über die Fmoc-Chemie. Desweiteren lässt sich der benötigte Thioester bei der Boc-Chemie direkt bei der Synthese einführen und die für die Boc-Synthese benötigten Chemikalien sind günstiger.

Die zu synthetisierenden Peptide hatte eine Länge von 38 bis zu 58 Aminosäureresten. An den C-Terminus der Peptide 1 bis 5 wurde ein Thioester für die spätere Ligation synthetisiert. Beim Peptid 3 stellte es sich als notwendig heraus, an den Thioester zusätzlich einen Tetra-Arginin-*tag* zu synthetisieren, weil dies die Löslichkeit dieses Peptides deutlich verbesserte und dadurch die Reinigung überhaupt erst ermöglichte[26,30-32].

Der N-terminale Aminosäurerest der Peptide 2 bis 6 musste für die später durchzuführende Ligation ein Cysteinrest sein. Da bis auf die letzte Ligation immer zwei Peptide mit jeweils N-terminalem Cysteinrest eingesetzt wurden, musste der Cysteinrest, der für die nächste Ligation benötigt wird, geschützt sein, da es sonst zur Bildung von ungewünschten Nebenprodukten (z.B. Cyclisierung des Peptides mit freiem Cystein und Thioester) gekommen wäre. Deshalb wurde bei den Peptiden 2-5 das N-terminale Cystein als 1,3-Thiazolidin eingeführt, das sich nach erfolgter Ligation durch Entschützen in ein Cystein umwandeln ließ und so das Ligationsprodukt für die nächste Ligation vorbereitete.

Die Synthesen wurden hauptsächlich im 0,4 mmol-Maßstab durchgeführt. Die Ansätze waren nicht ohne weiteres skalierbar, weil es bei größeren Ansätzen zu praktischen Problemen bei den einzelnen Reaktionsschritten kam. Zum Beispiel konnte das Waschen des Kopplungsharzes nicht schnell und erschöpfend genug durchgeführt werden, was zu Fehlkopplungen führte. Eine Verdoppelung des Ansatzes führte deshalb nicht zu einer Verdoppelung des Syntheseproduktes. Falls dennoch eine größere Produktmenge erforderlich war, wurden daher Parallelansätze jeweils im 0,4 mmol Maßstab durchgeführt.

Die anfänglichen Synthesen erfolgten nach dem Boc-Synthese-Protokoll aus der Engelhard-Gruppe (MPI Dortmund, BRD), wobei jede Aminosäure zwecks Ausbeuteerhöhung und Reinheitsverbesserung doppelt gekoppelt wurde. Demgegenüber verwendete das Boc-Synthese-Protokoll der Kent-Gruppe (University of Chicago, USA) prinzipiell eine einfache Kopplung, bei spürbarer Zeit- und Chemikalienersparnis. Dieses Protokoll erwies sich im direkten Vergleich nicht nur als eindeutig schneller und kostengünstiger, auch die Qualität des Produktes war auf keinen Fall schlechter als das Produkt aus Doppelkopplungen. Auf Grund dieser Vorteile wurden nach meinem Aufenthalt in Chicago im Kent-Labor alle Synthesen nach dem dort verwendeten Protokoll durchgeführt.

Die wichtigsten Unterschiede zwischen den beiden Protokollen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Unterschiede der Syntheseprotokolle

	Dortmund-Protokoll	*Chicago-Protokoll*
Aminosäureüberschuss	10x	5,5x
Doppel-Kopplung	ja	nein
Kopplungszeit :		
1.-20.Kopplung	10 min	12 min
20.-X. Kopplung	30 min	15 min

Die Ausbeute einer Peptidsynthese lässt sich auf Grund der vielen Variablen nicht klar voraussagen. Die Ausbeute hängt z.B. ab

- vom Syntheseprotokoll
- von der Peptidlänge
- von jeder einzelnen Kopplungsausbeute
- diese (auch) von der Sequenz
- von der Qualität des verwendeten Syntheseharzes
- von der Qualität der verwendeten Chemikalien
- von der Sorgfalt bei jeder einzelnen Kopplung

Insgesamt gesehen sinkt die Ausbeute mit der Länge des zu synthetisierendes Peptides. Außerdem gilt: je hydrophober ein Peptid ist, desto schwieriger wird dessen Aufreinigung. Für das Nachvollziehen der von mir erreichten Ausbeuten meiner 0,4 Millimol-Synthesen habe ich in Tabelle 3.3 die Produktmenge der Peptide aufgeführt, die man bei quantitativer Kopplungsausbeute erhielte und es außerdem keine Verluste während der Aufreinigung gäbe

Tabelle 3.3: Ideale Produktmengen von 0,4 Millimol-Synthesen

	Menge von 0,4 mmol Peptid [mg]
Peptid 1	2607
Peptid 2	2319
Peptid 3	1810
Peptid 4	2168
Peptid 5	2154
Peptid 6	2089

Diese Mengen wurden erwartungsgemäß bei keiner durchgeführten Synthese auch nur ansatzweise erreicht. Die Menge der nach HF-Abspaltung erhaltenen Rohpeptide lag bei meinen Synthesen nur bei ca. 800 bis 1200 mg. Dies entspricht einem Ausbeuteverlust von ca. 50 %. Die Aufreinigung der Rohpeptide zeigte, dass sich aus dieser Menge je nach Peptid und Synthese ca. 5-12 % sauberes Peptid isolieren ließ. Die Ergebnisse der Aufreinigung der Rohpeptide sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Die zunächst gering erscheinende Ausbeute bei der Synthese ist im Wesentlichen eine Folge der Länge der synthetisierten Peptide. Da die Kopplung der Aminosäuren nicht ganz quantitativ ist (~ 99,5 %)[33], erhöht sich mit jeder Kopplung der Anteil an Syntheseprodukt mit unerwünschter Aminosäuresequenz. In Abbildung 3-1 wird das Chromatogramm des Endproduktes der Synthese von Peptid 1 mit dem

Chromatogramm eines Zwischenproduktes (Testabspaltung nach 46 der insgesamt 60 Kopplungen) verglichen.

Tabelle 3.4: Ausbeuten der Rohpetidreinigung

	eingesetztes Rohpeptid [mg]	*daraus gewonnenes sauberes Peptid [mg]*	*Anteil des Peptides im Rohpeptid [%]*
Peptid 1	210	17,3	8,2
Peptid 2	300	25,6	8,5
Peptid 3	420	48,5	11,5
Peptid 4	900	47,4	5,3
Peptid 5	3040	159	5,2
Peptid 6	1540	175,9	11,4

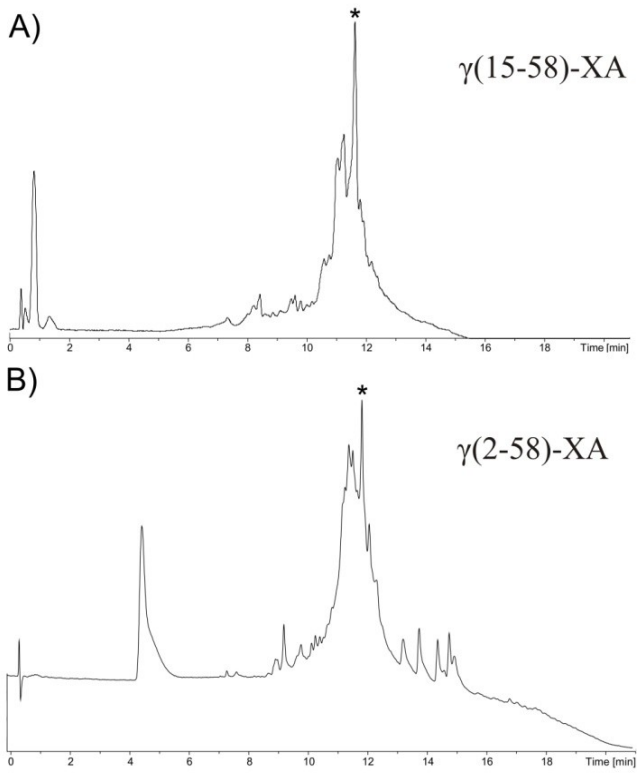


Abbildung 3-1: Analytische HPLC-Läufe der Peptid 1-Synthese

Verglichen wird hier die Chromatographie des Endproduktes der Synthese mit der Chromatographie einer Test-Abspaltung nach 46 der insgesamt 60 Kopplungen. Die mit dem Stern markierten Peaks enthalten das Produkt (lt. Massenspektrometrie, hier nicht gezeigt). A) UV-Chromatogramm (211nm) der Testabspaltung nach 46 der 60 Kopplungen. B) UV-Chromatogramm (211nm) des Syntheseproduktes. Der Peak zwischen 4 und 5 min ist ein durch die verwendete Säule hervorgerufenes Artefakt. Beide Chromatographien: linearer Gradient von 5-65% Puffer B in 15 min bei 40°C. Puffer A : 0,1% TFA in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril.

Die wachsende Peptidkette könnte sich ab einer gewissen Länge zusätzlich negativ auf die Syntheseeffizienz auswirken, indem das reaktive Ende sterisch behindert würde. Auch ist denkbar, dass nicht alle Aminofunktionen auf dem Syntheseharz aufgrund der räumlichen Gegebenheiten verfügbar sind. Ein messbarer Verlust an Produkt während der HF-Abspaltung war nicht feststellbar, da das abgespaltene Produkt zusammen mit dem freien Harz annähernd die gleiche Masse besaß, wie das rohe Syntheseprodukt vor der HF-Abspaltung. Wie bei jeder Chromatographie kommt es auch bei den Aufreinigungen von Peptiden mittels HPLC zu Ausbeuteverlusten. Es wurde kein Versuch unternommen, diese Verluste mengenmäßig zu bestimmen.

Abbildung 3-2 zeigt die Ausbeuteverluste bei den Synthesen mit einer maßstabgetreuen Darstellung der Massen.

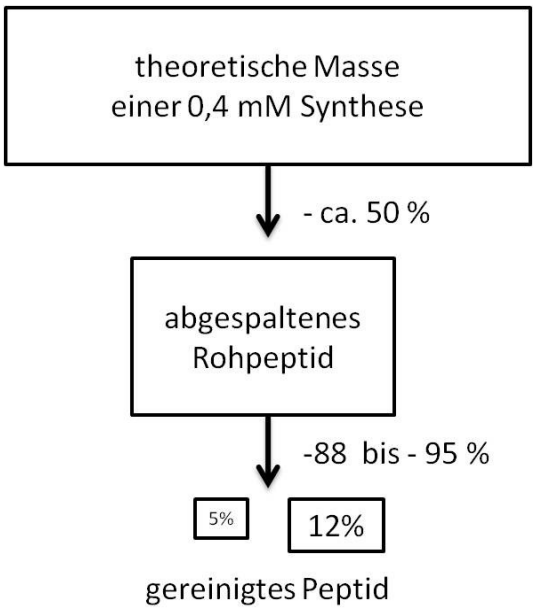


Abbildung 3-2: Maßstabsgetreue Darstellung der Syntheseausbeuten bei Peptidsynthesen

Die abgespaltenen Rohpeptide wurden standardmäßig mit einer Grace Vydac C4 halb-präparativen Säule (10 x 250 mm) gereinigt. Die Probenmenge betrug bei den Reinigungen zwischen 150 und 200 mg Rohprodukt. Die jeweils verwendeten Gradienten wurden für jedes einzelne Peptid im Vorfeld durch analytische Chromatographien optimiert.

Die analytischen HPLC-Läufe wurden mit C4- oder C8-Säulen (2,1 x 50 mm) durchgeführt. Durch die Verwendung unterschiedlicher Säulen sind die Retentionszeiten der in den Abbildungen gezeigten analytischen Chromatographien nicht immer miteinander vergleichbar. Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Retentionszeiten ist die Verwendung unterschiedlicher HPLC-Anlagen.

3.1.1.3 Ergebnisse

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Peptidsynthesen zusammengestellt (Abbildung 3-3 und Abbildung 3-4, auf den beiden Folgeseiten). Die einzelnen Synthesen sind jeweils durch Chromatogramme des Rohpeptids sowie durch Chromatogramme des nachgereinigten Peptids dokumentiert. Ein guter Syntheseerfolg zeichnete sich durch einen klar erkennbaren Produktpeak bei relativ wenigen Verunreinigungen aus. Die Qualität der einzelnen Rohpeptide war so gut, dass von allen Peptiden ausreichende Mengen isoliert werden konnten. Ein überaus gutes Syntheseergebnis ergab sich bei der Synthese von Peptid 3 (Abbildung 3-3). Das zugehörige Chromatogramm zeigt einen hohen und schmalen Produktpeak und nur wenige und im Vergleich deutlich niedrigere Peaks der Verunreinigungen. Eine Ursache für die gute Qualität könnte in der Länge dieses Peptides liegen, das es mit 44 Resten (inklusive Arginin-*tag* und Thioester) das kleinste der synthetisierten Peptide war.

Da bei der Reinigung der Rohpeptide der Schwerpunkt auf die Qualität und nicht die Quantität gelegt wurde, waren alle gereinigten Peptide so sauber, dass, wenn überhaupt, nur geringste Verunreinigungen festzustellen waren. Die gute Qualität der Peptide war eine Voraussetzung für die spätere erfolgreiche Ligation, da es durch Verunreinigungen wie z.B. Peptide mit fehlenden Aminosäuren, zur Bildung von Nebenprodukten kommt, die meist nicht mehr vom gewünschten Produkt abzutrennen sind.

In Abbildung 3-3 sind die Chromatogramme der Rohpeptide und in Abbildung 3-4 die Chromatogramme der gereinigten Peptide zusammengefasst. Es ist ersichtlich, dass das Ziel, saubere Peptide mit der gewünschten Masse (und daher Sequenz) herzustellen, in allen Fällen weitestgehend erreicht wurde.

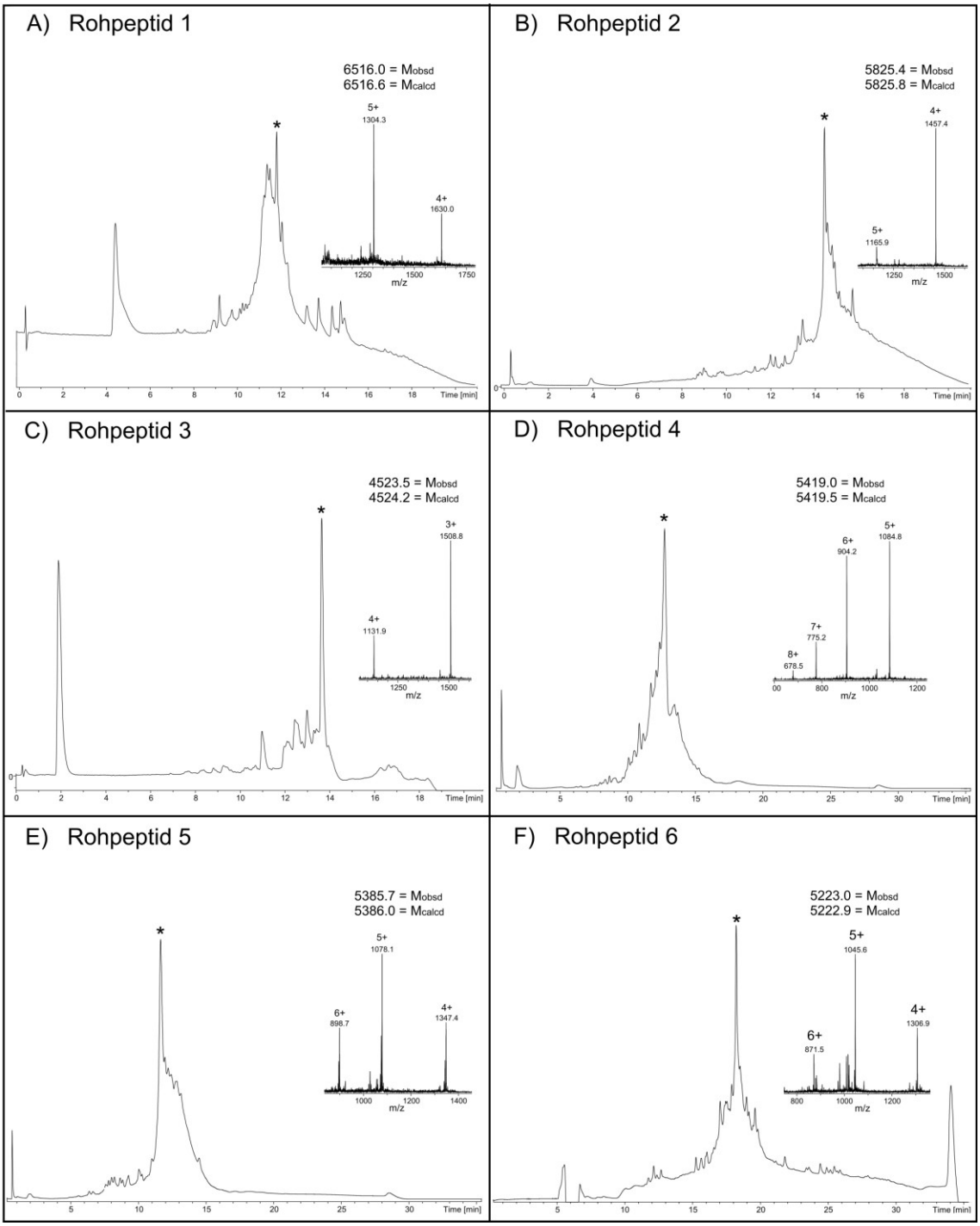


Abbildung 3-3: Analytische HPLC-MS mit den sechs Rohpeptiden

UV-Chromatogramme (211nm). Der Stern in den Abbildungen markiert den jeweiligen Produkt-Peak und das Massenspektrum zeigt das ESI-MS dieses Peaks. Die Massenberechnung erfolgte mit den durchschnittlichen Isotopenmassen. Mobsd = gemessene Masse, Mcalcd = berechnete Masse

Chromatogramme A,B und C: Linearer Gradient von 5-65% Puffer B in 15 min bei 40°C. Puffer A : 0,1% TFA in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril. Chromatogramme D,E und F: Linearer Gradient von 0-100% Puffer B in 23 min bei RT. Puffer A : 0,1% TFA in 20% Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril.

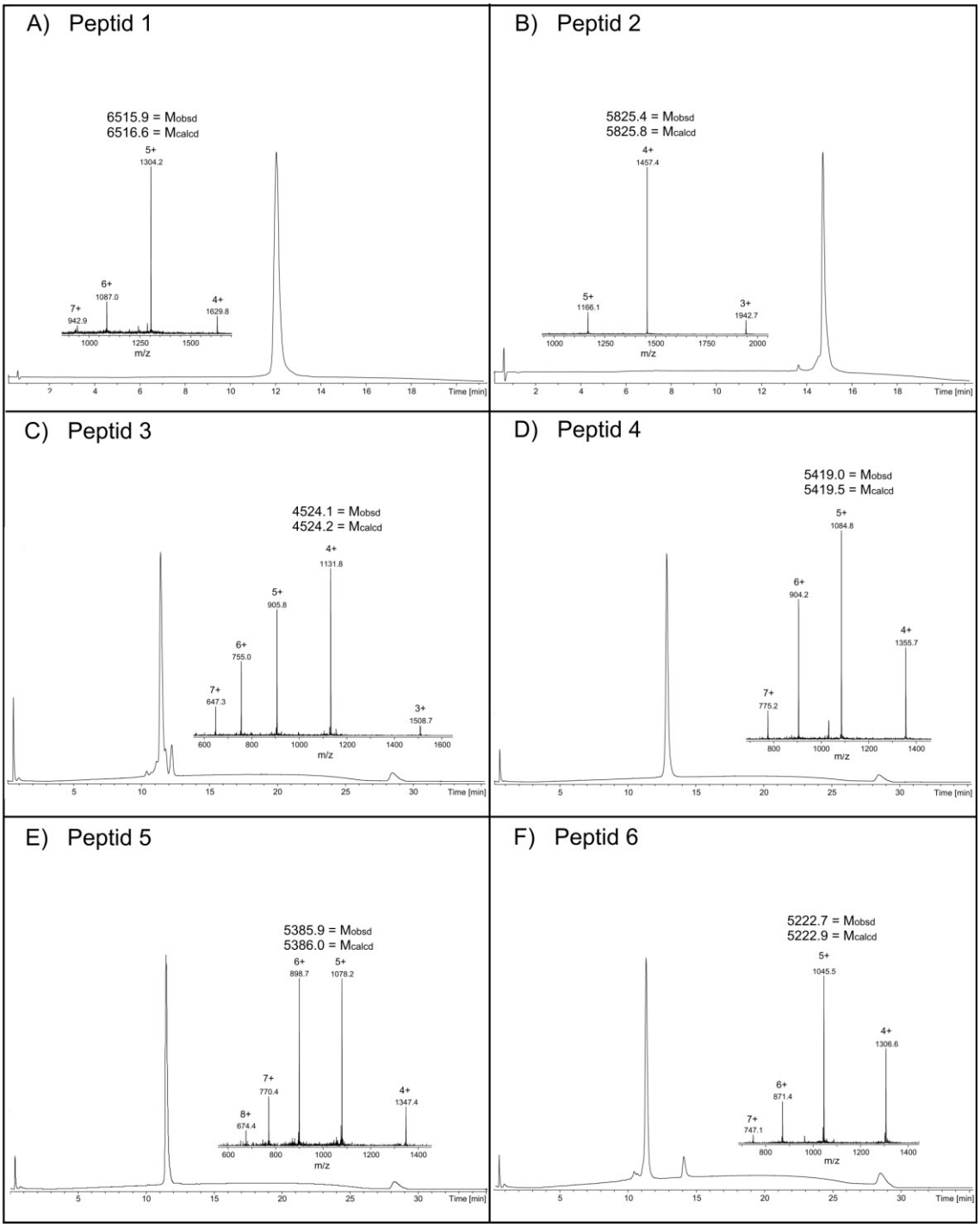


Abbildung 3-4: Analytische HPLC-MS mit den gereinigten Peptiden

UV-Chromatogramme (211nm). Das Massenspektrum zeigt das ESI-MS des Haupt-Peaks. Die Massenberechnung erfolgte mit den durchschnittlichen Isotopenmassen. Mobsd = gemessene Masse, Mcalcd = berechnete Masse

Chromatogramme A und B : Linearer Gradient von 5-65% Puffer B in 15 min bei 40°C. Puffer A : 0,1% TFA in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril. Chromatogramme B,D,E und F: Linearer Gradient von 0-100% Puffer B in 23 min bei RT. Puffer A : 0,1% TFA in 20% Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril.

3.1.2 Ligation der Peptide

3.1.2.1 Durchführung

Die Ligation der Peptide erfolgte konsekutiv. Das bedeutet, dass als erstes die Peptide 5 und 6 miteinander ligiert und dann die weiteren Peptide nacheinander an das vorhergehende Produkt gekoppelt wurden, d.h. ein schrittweiser Aufbau von γ vom C-terminalen in Richtung N-terminales Ende. Der gesamte Ligationsablauf ist als Flusschema in Abbildung 3-5 auf der folgenden Seite zusammengefasst.

Es wurde zu Beginn versucht, die ersten beiden Ligationen in einer *one-pot*-Ligation [22] ohne zwischenzeitliche Aufreinigung durchzuführen. Dieser Versuch lieferte aber kein befriedigendes Ergebnis bzgl. Ausbeute und Reinheit des Ligationsproduktes. Diese Vorgehensweise wurde deshalb nicht weiter verfolgt. Eine konvergente Synthese wurde aufgrund der nicht abzuschätzenden Erfolgsaussichten der nötigen zweistufigen kinetisch kontrollierten Ligation nicht in Betracht gezogen.

Die Ligationen erfolgten im Ligationspuffer (6 M GdnHCl, 100 mM Na_2HPO_4, pH 7) mit MPAA als Thiol-Aktivator sowie TCEP als Reduktionsmittel. In sind die MPAA- und TCEP-Konzentrationen in den einzelnen Ligation angegeben. (Abkürzungsverzeichnis s. Seite 153.).

Tabelle 3.5: MPAA und TCEP Konzentration in den Ligationsansätzen

	Ligation1	*Ligation 2*	*Ligation 3*	*Ligation4*	*Ligation 5*
MPAA [mM]	100	100	100	100	100
TCEP [mM]	20	20	40	40	40

Jede Ligation wurde 23 Stunden lang durchgeführt. In den ersten zwei Stunden wurde der Ligationsansatz bei 37 °C und danach bei 20 °C inkubiert. In der Regel war die Ligation nach zwei Stunden fast vollständig abgelaufen, wurde dann aber zur Ausbeutenverbesserung über Nacht fortgeführt. Fast vollständig bedeutet in diesem Zusammenhang, dass nur noch eine minimale zeitliche Veränderung der Konzentrationen der Edukte und Produkte mittels HPLC nachgewiesen werden konnte. Die Inkubation bei 37 °C sollte die Geschwindigkeit der Ligation steigern. Bei der ersten Ligation von Peptid 5 mit Peptid 6 wurde der Einfluss der Temperatur auf die Ligationsgeschwindigkeit untersucht.

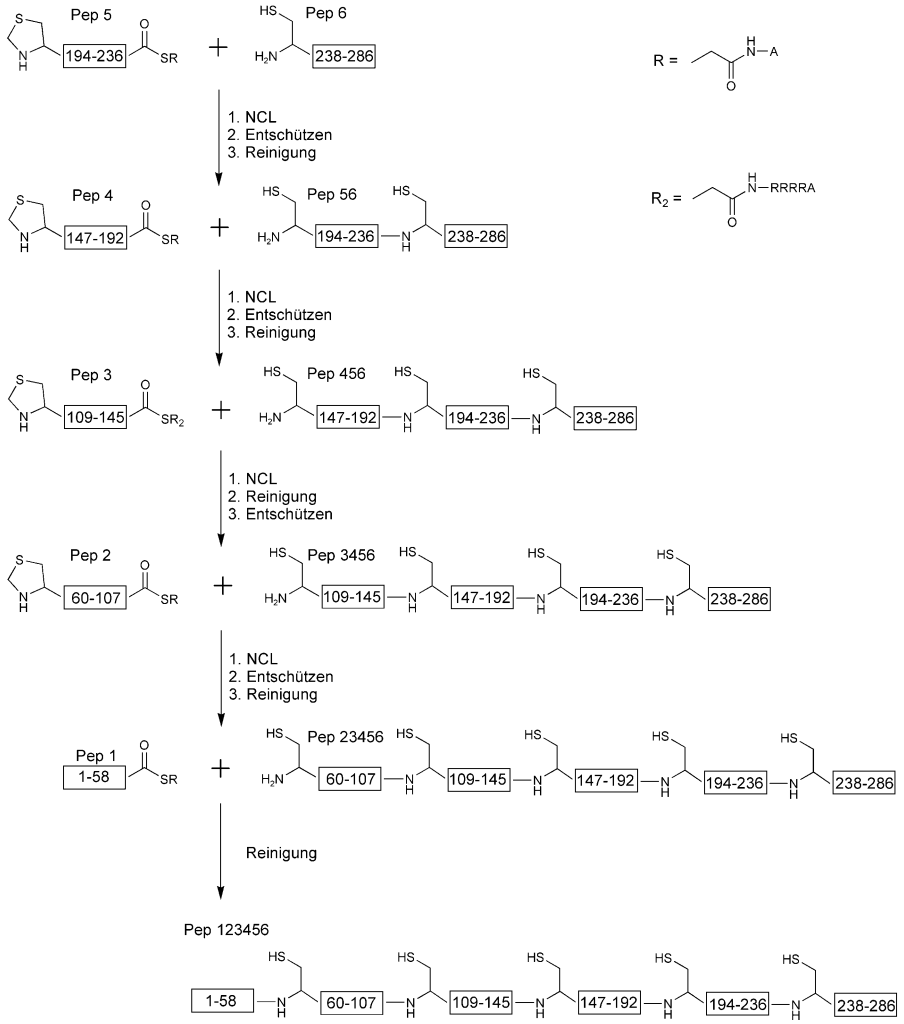


Abbildung 3-5: Flussschema der konsekutiven Ligation

NCL: native chemische Ligation, Entschützen: Umwandlung des 1,3-Thiazolidins in Cystein, Reinigung mittels HPLC. Die einzelnen Ligationen sind im Text fortlaufend nummeriert, die jeweiligen Ligationsprodukte (Peptide) tragen die Nummern der verwendeten Ausgangspeptide: Ligation 1 koppelt die Peptide 5 und 6 zum Ligationsprodukt 56, Ligation 2 koppelt die Peptide 4 und das Ligationsprodukt der ersten Ligation, Peptid 56, zum Ligationsprodukt/Peptid 456 usw.

Die Erhöhung der Temperatur auf 37 °C verdoppelte in etwa die Ligations-Geschwindigkeit im Vergleich zu einer Ligation bei 20°C. Eine fast vollständige Ligation wurde hier schon nach zwei statt der sonst üblichen vier Stunden Reaktionszeit erreicht. Die Inkubation bei 37 °C wurde nur zwei Stunden durchgeführt, da dann die Ligation in der Regel schon fast abgeschlossen war und durch die erhöhte Temperatur natürlich auch die Geschwindigkeit der Nebenreaktionen, wie z.B. die Oxidation des MPAA, erhöht wurde. Ob die Erhöhung der Temperatur einen Einfluss auf die Produktqualität hatte, wurde nicht untersucht.

Die Ligationen wurden mit einer maximalen Peptidkonzentration von ca. 20 mg/ml durchgeführt. Dabei wurde das Peptid mit dem Thioester in einem 20 %igen molaren Überschuss eingesetzt. Dies sollte die Ausbeute der Ligation erhöhen, da der Thioester durch ungewollte Nebenreaktionen mit den nicht terminalen Cysteinen sowie mit Luftsauerstoff abreagieren konnte. Ab der dritten Ligation war es zudem ohne Probleme möglich, den Thioester in erhöhter Menge darzustellen, da durch die geringen Ausbeuten der Ligationen und der steigenden molaren Masse der Ligationsprodukte die benötigte Thioester-Peptidmenge von Ligation zu Ligation stark sank.

Zwischen den einzelnen Ligationen wurde das Ligationsprodukt direkt im Ligationsansatz entschützt (das 1,3-Thiazolidin wurde in das Cystein überführt) und dann mittels HPLC gereinigt. Nur das Ligationsprodukt der dritten Ligation wurde zuerst gereinigt und danach entschützt, da das entschützte Produkt Schwierigkeiten bei der Reinigung machte. Die nötige Entschützung dieses Produktes wurde dann direkt vor der nächsten Ligation (im späteren Ligationspuffer) durchgeführt.

3.1.2.2 Ergebnisse

Ligation 1 (Peptid 5 + Peptid 6)

Diese Ligation wurde auf Grund der großen Peptidmenge insgesamt dreizehnmal durchgeführt. Zehnmal wurde eine Ligation mit ca. 10 mg und dreimal eine Ligation mit ca. 5 mg Peptid 6 durchgeführt. Der molare Überschuss von Peptid 5 betrug 20 %. Abbildung 3-6 zeigt den Verlauf dieser Ligation und Abbildung 3-7 zeigt eine analytische HPLC-MS-Analyse des gereinigten Ligationsproduktes. Bei diesen Ligationen konnten keine Besonderheiten festgestellt werden, so dass nicht vom Standardprotokoll abgewichen werden musste. In Tabelle 3.6 sind die eingesetzten Peptidmengen und die Ausbeute dieser Ligation aufgeführt.

Tabelle 3.6: Ligation 1: Peptidmengen und Ausbeute

	Peptid 5	*Peptid 6*	*Peptid 56*	*Ausbeute*
mg	142	115	68,9	
µmol	26,42	22,02	6,61	30 %

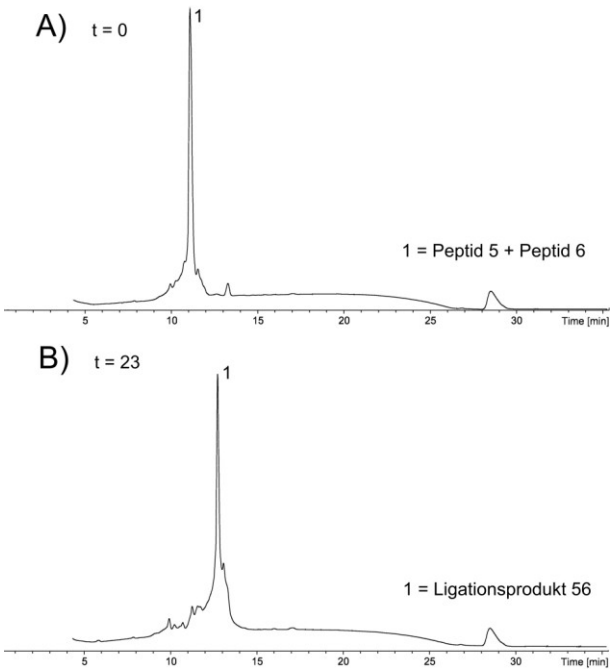


Abbildung 3-6: Zeitlicher Verlauf von Ligation 1

A) Ligation zum Zeitpunkt t = 0, B) Ligation zum Zeitpunkt t = 23 h. UV-Chromatogramme (211nm). Linearer Gradient von 0-100% Puffer B in 23 min bei RT. Puffer A : 0,1% TFA in 20% Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril. Unter diesen Bedingungen liefen die Peptide 5 und 6 mit der gleichen Retentionszeit.

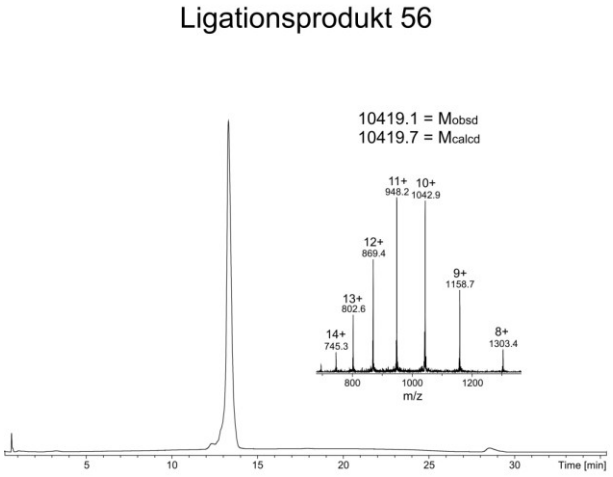


Abbildung 3-7: HPLC-MS des Ligationsproduktes von Ligation 1

UV-Chromatogramm (211nm). Linearer Gradient von 0-100% Puffer B in 23 min bei RT. Puffer A : 0,1% TFA in 20% Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril. Das Massenspektrum zeigt das ESI-MS des Haupt-Peaks. Die Massenberechnung erfolgte mit den durchschnittlichen Isotopenmassen. Mobsd = gemessene Masse, Mcalcd = berechnete Masse

Ligation 2 (Peptid 4 + Peptid 56)

Diese Ligation wurde auf Grund der großen Peptidmenge insgesamt siebenmal durchgeführt. Sechsmal wurde eine Ligation mit ca. 10 mg und einmal eine Ligation mit ca. 8 mg Ligationsprodukt 56 durchgeführt. Der molare Überschuss von Peptid 4 betrug 20 %. Abbildung 3-8 zeigt den Verlauf dieser Ligation und Abbildung 3-9 zeigt eine HPLC-MS-Analyse des gereinigten Ligationsproduktes. Auch bei diesen Ligationen traten keine Auffälligkeiten auf, daher gelangte ebenfalls das Standardprotokoll zur Anwendung. In Tabelle 3.7 sind die eingesetzten Peptidmengen und die Ausbeute dieser Ligation aufgeführt.

Tabelle 3.7: Ligation 2: Peptidmengen und Ausbeute

	Peptid 4	*Peptid 56*	*Peptid 456*	*Ausbeute*
mg	43	68,9	24,3	
µmol	7,92	6,61	1,55	23,5 %

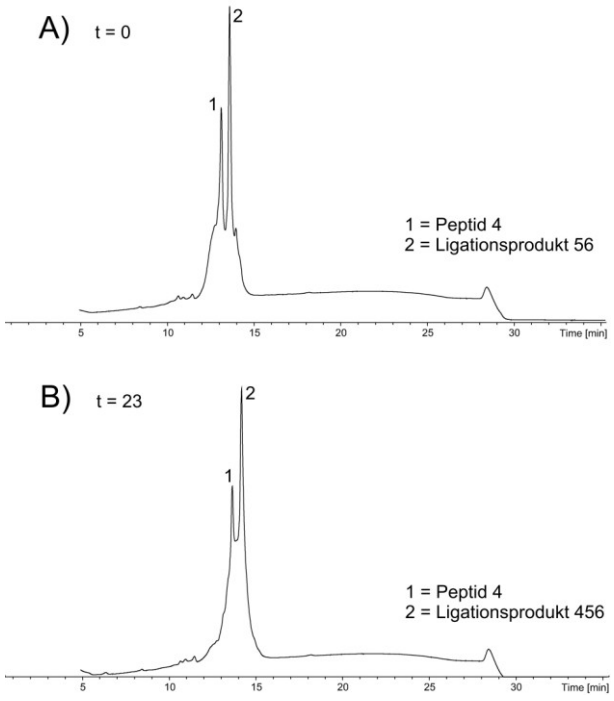


Abbildung 3-8: Zeitlicher Verlauf von Ligation 2

A) Ligation zum Zeitpunkt t = 0, B) Ligation zum Zeitpunkt t = 23 h. UV-Chromatogramme (211nm). Linearer Gradient von 0-100% Puffer B in 23 min bei RT. Puffer A : 0,1% TFA in 20% Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril.

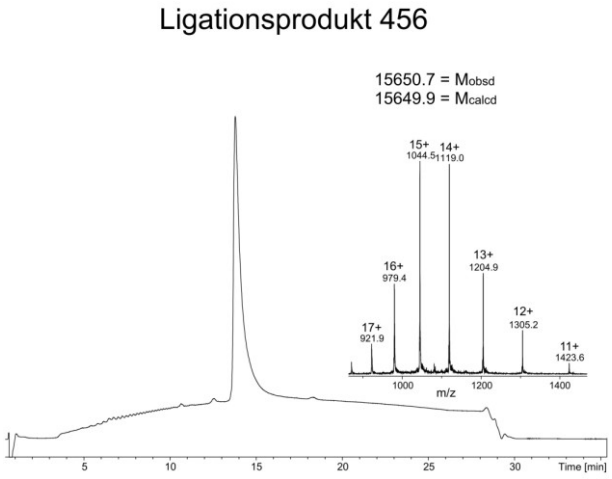


Abbildung 3-9: HPLC-MS des Ligationsproduktes von Ligation 2

UV-Chromatogramm (211nm). Linearer Gradient von 0-100% Puffer B in 23 min bei RT. Puffer A : 0,1% TFA in 20% Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril. Das Massenspektrum zeigt das ESI-MS des Haupt-Peaks. Die Massenberechnung erfolgte mit den durchschnittlichen Isotopenmassen. Mobsd = gemessene Masse, Mcalcd = berechnete Masse

Ligation 3 (Peptid 3 + Peptid 456)

Diese Ligation wurde insgesamt dreimal durchgeführt, zweimal mit ca. 10 mg und einmal mit ca. 4 mg Peptid 456. Der jeweilige molare Überschuss von Peptid 3 betrug wieder 20 %. Bei der ersten dieser Ligationen wurde das Ligationsprodukt wie gewohnt im Ligationsansatz entschützt. Bei der Reinigung des Produktes zeigte sich jedoch, dass das Produkt, sowie das ebenfalls nun entschützte, restliche Peptid 3 nur noch in geringem Umfang von der Chromatographiesäule eluierten. Dieses Problem konnte umgangen werden, indem das Produkt vor der Reinigung nicht entschützt wurde. Dann ließ es sich wie gewohnt chromatographieren. Für die nächste Ligation musste es natürlich trotzdem entschützt werden. Da das Methoxyamin-Hydrochlorid (MAH), das für das Entschützen verwendet wurde, in der Regel nicht mit der Ligation interferiert [22], wurde das Ligationsprodukt direkt vor der nächsten Ligation im Ligationspuffer entschützt und das Methoxyamin-Hydrochlorid im Ligationsansatz belassen. Abbildung 3-10 zeigt den Verlauf dieser Ligation und Abbildung 3-11 eine analytische HPLC-MS mit gereinigtem Peptid 3456. In Tabelle 3.8 sind die eingesetzten Peptidmengen und die Ausbeute dieser Ligation zusammengefasst.

Tabelle 3.8: Ligation 3: Peptidmengen und Ausbeute

	Peptid 3	*Peptid 456*	*Peptid 3456*	*Ausbeute*
mg	8,4	24,3	2,56	
µmol	1,86	1,55	0,13	8,5 %

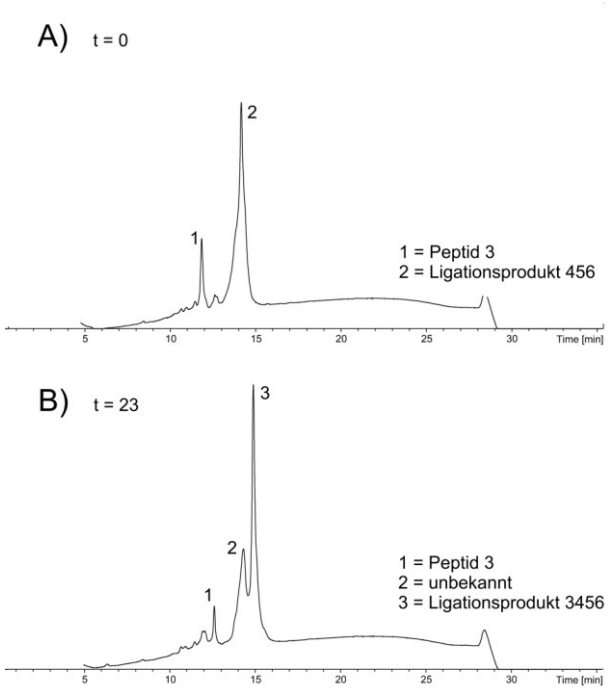


Abbildung 3-10: Zeitlicher Verlauf von Ligation 3

A) Ligation zum Zeitpunkt t = 0, B) Ligation zum Zeitpunkt t = 23 h. UV-Chromatogramme (211nm). Linearer Gradient von 0-100% Puffer B in 23 min bei RT. Puffer A : 0,1% TFA in 20% Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril.

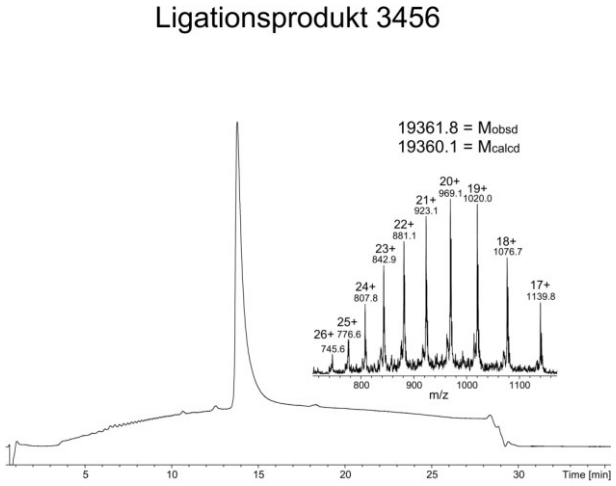


Abbildung 3-11: HPLC-MS des Ligationsproduktes von Ligation 3

UV-Chromatogramm (211nm). Linearer Gradient von 0-100% Puffer B in 23 min bei RT. Puffer A : 0,1% TFA in 20% Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril. Das Massenspektrum zeigt das ESI-MS des Haupt-Peaks. Die Massenberechnung erfolgte mit den durchschnittlichen Isotopenmassen. Mobsd = gemessene Masse, Mcalcd = berechnete Masse

Ligation 4 (Peptid 2 + Peptid 3456)

Diese Ligation wurde insgesamt zweimal durchgeführt, zuerst mit ca. 2 mg und dann mit ca. 0,6 mg von Peptid 3456. Der molare Überschuss von Peptid 2 betrug wiederum 20 %. Da das Ligationsprodukt 3456 aufgrund der oben erwähnten Reinigungsproblematik nicht sofort im Ligationspuffer der vorangegangenen Ligation entschützt werden konnte, erfolgte die Entschützung unmittelbar vor der Ligation.

Dazu wurde Peptid 3456 in 1 ml 6 M GdnHCl-Puffer mit 300 mM MAH bei pH 4 entschützt, dann der pH auf 7 eingestellt und die Lösung mit derselben Menge an doppelt konzentriertem Ligationspuffer (mit MPAA und TCEP) versetzt. Nun wurde Peptid 2 hinzugefügt und die Ligation wie gewohnt durchgeführt.

Aufgrund des Reinigungsproblems bei der vorherigen Ligation und der einfach umzusetzenden späteren Entschützung wurde diese Vorgehensweise auch für die letzte Ligation beibehalten. Abbildung 3-12 zeigt den Verlauf der Ligation und Abbildung 3-13 eine HPLC-MS-Analyse des gereinigten Ligationsproduktes Peptid 23456. Tabelle 3.9 fasst die eingesetzten Peptidmengen und die Ausbeute dieser Ligation zusammen.

Tabelle 3.9: Ligation 4: Peptidmengen und Ausbeute

	Peptid 2	*Peptid 3456*	*Peptid 23456*	*Ausbeute*
mg	0,92	2,56	0,33	
µmol	0,16	0,13	0,013	10 %

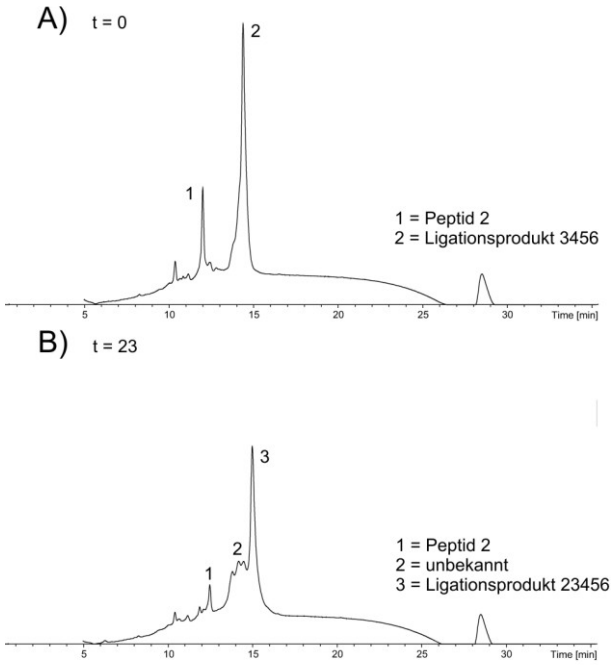


Abbildung 3-12: Zeitlicher Verlauf von Ligation 4

A) Ligation zum Zeitpunkt t = 0, B) Ligation zum Zeitpunkt t = 23 h. UV-Chromatogramme (211nm). Linearer Gradient von 0-100% Puffer B in 23 min bei RT. Puffer A : 0,1% TFA in 20% Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril.

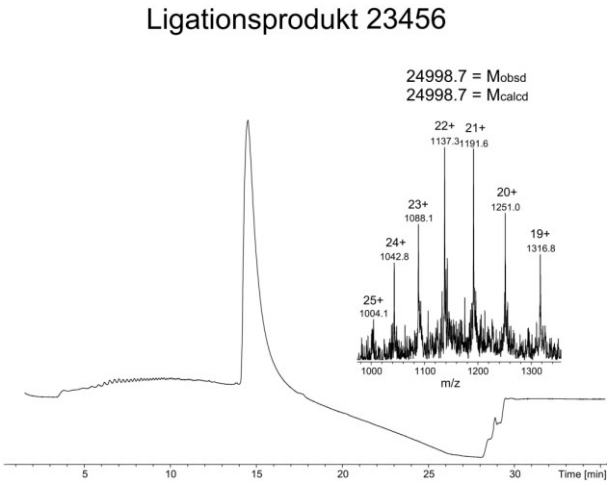


Abbildung 3-13: HPLC-MS des Ligationsproduktes von Ligation 4

UV-Chromatogramm (211nm). Linearer Gradient von 0-100% Puffer B in 23 min bei RT. Puffer A : 0,1% TFA in 20% Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril. Das Massenspektrum zeigt das ESI-MS des Haupt-Peaks. Die Massenberechnung erfolgte mit den durchschnittlichen Isotopenmassen. Mobsd = gemessene Masse, Mcalcd = berechnete Masse

Ligation 5 (Peptid 1 + Peptid 23456)

Bei dieser Ligation wurde das Peptid 1 nicht im üblichen 20%igen Überschuss eingesetzt, sondern sechsfach, in der Hoffnung, die Ligationsausbeute möglicherweise zu erhöhen. Da Peptid 23456 nur mittels HPLC gereinigt und noch nicht entschützt worden war, wurde die Entschützung wie bei der vorangegangenen Ligation direkt im späteren Ligationspuffer durchgeführt. Unerwarteterweise zeigte sich bei der Ligation, dass das zum Entschützen eingesetzte Methoxyamin-Hydrochlorid vollständig mit Peptid 1 abreagierte, die eigentliche Ligation somit verhinderte.

Diese Nebenreaktion wurde massenspektrometrisch nachgewiesen, wobei Peptid 1 (ohne den schon abgespaltenen Thioester) eine um ca. 29 Da größere Masse aufwies. Die Nebenreaktion des Methoxyamins mit Peptid 1 folgt aus der Molmasse des Methoxyamins, 47,06 g/mol. Wenn dieses Amin mit dem aktivierten Thioester reagiert, kommt es unter Abspaltung von Wasser zur Kondensationsreaktion zwischen den beiden Verbindungen. Unter Abzug der Molmasse von Wasser (18,02 g/mol) ergibt sich dann eine Massendifferenz von 29 Da. In Abbildung 3-14 wird das mögliche Reaktionsschema dieser Reaktion gezeigt.

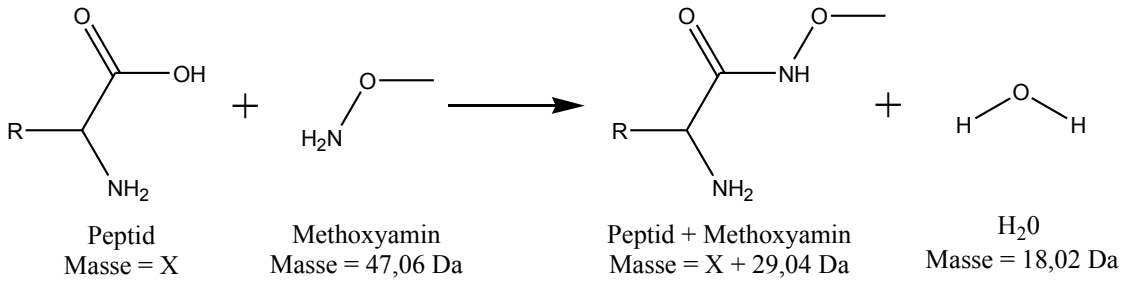


Abbildung 3-14: Mögliche Reaktionsgleichung der Nebenreaktion zwischen einem Peptid und MAH

Zwar enthält Peptid 1 auch zwei Asparaginsäure- und zwei Glutaminsäure-Reste, doch hätte eine Nebenreaktion des Methoxyamins auch mit diesen beiden Resten schon bei den vorherigen Ligationen auffallen müssen. Der entscheidende Hinweis darauf, dass der Thioester mit dem Amin reagiert hatte, war das Ausbleiben der Ligation in diesem einen Fall in Gegenwart von Methoxyamin im Ligationspuffer. Folglich musste das MAH aus dem Ligationsansatz entfernt werden. Zu diesem Zweck musste daher der Ligationsansatz komplett rechromatographiert werden. Die dabei erlittenen

Ausbeuteverluste konnten wegen der ohnehin minimalen Produktmenge nicht bestimmt werden.

Nach der Reinigung wurde die Ligation erneut angesetzt. Bei der erneuten Ligation wurde Peptid 1 in derselben Menge wie zuvor eingesetzt, ohne die Produktverluste zu berücksichtigen.

Der Ligationsverlauf konnte mittels analytischer HPLC-ESI-MS zwar verfolgt werden, aber nur über das UV-Chromatogramm, da das Produkt im MS-Spektrum nicht nachgewiesen werden konnte. Das lag unter anderen an einer derart geringen Produktmenge, dass deren MS-Signale von den Hintergrundsignalen überdeckt wurden. Ein Grund für die starken Hintergrundsignale war wahrscheinlich die Verwendung einer durch eine große Anzahl von Chromatographien gealterten Chromatographiesäule.

Daher wurde das Ligationsprodukt (das mutmaßliche Vollängen-γ) mittels MALDI-MS analysiert und so der Syntheseerfolg belegt. Die Masse von 31334,8 Da weicht nur 1,4 Da von der theoretischen Masse (31336,2) ab, was eine vernachlässigbare Differenz im Rahmen der MALDI-Messgenauigkeit. Das „Ligationsprodukt 123456“ war tatsächlich vollsynthetisches γ.

Abbildung 3-15 zeigt den Verlauf dieser Ligation und Abbildung 3-16 zeigt die MALDI-MS-Analyse des gereinigten Ligationsproduktes. In Tabelle 3.10 sind die eingesetzten Peptidmengen und die Ausbeute dieser Ligation aufgeführt. Die Abweichungen der Aminosäuresequenz des vollsynthetische synthetisierte γ von der Aminosäuresequenz des nativem γ sind in Tabelle 3.11 zusammengefasst.

Tabelle 3.10: Ligation 5: Peptidmengen und Ausbeute

	Peptid 1	*Peptid 23456*	*Peptid 123456*	*Ausbeute*
mg	0,5	0,33	0,033	
µmol	0,078	0,013	0,001	8,5 %

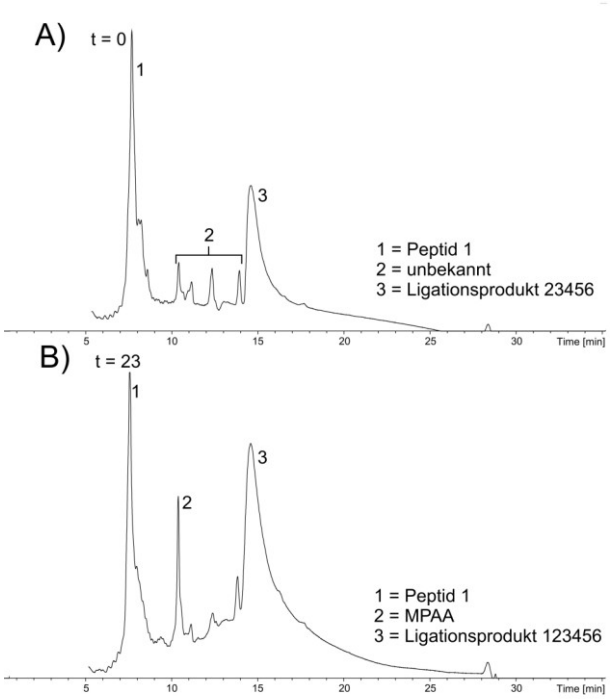


Abbildung 3-15: Zeitlicher Verlauf von Ligation 5

A) Ligation zum Zeitpunkt t = 0, B) Ligation zum Zeitpunkt t = 23 h. UV-Chromatogramme (211nm). Linearer Gradient von 0-100% Puffer B in 23 min bei RT. Puffer A : 0,1% TFA in 20% Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril.

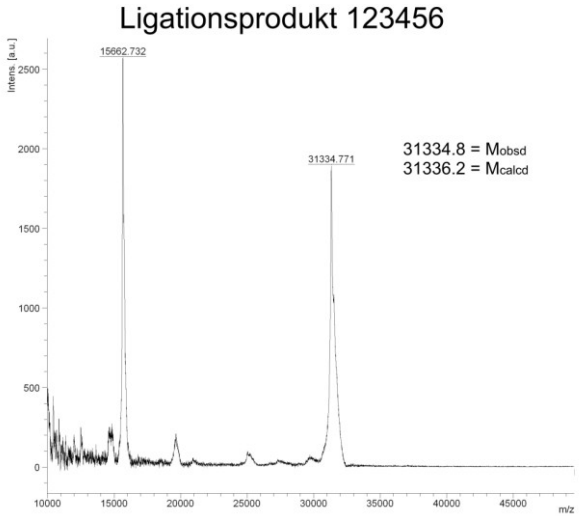


Abbildung 3-16: MALDI-MS-Analyse des Ligationsproduktes von Ligation 5

Das Massensignal von 31334,771 m/z steht für das einfach und das Massensignal 15662,732 m/z für das zweifach geladene Ion der totalsynthetischen γ-Untereinheit. Als Matrix wurde Sinapinsäure verwendet.

Tabelle 3.11 : Abweichungen in der Aminosäuresequenz des γ_{synth} vom γ_{nat}

Änderung	*Begründung*
E5D	Fehler in der Datenbank, wurde zu spät bemerkt
N59C	Cystein für Ligation
D107A	Bildung von Nebenprodukten (siehe Kapitel 5.7.1)
K108C	Cystein für Ligation, wird für Rotationstest benötigt
S146C	Cystein für Ligation
S193C	Cystein für Ligation
W203 mit CHO-Schutzgruppe	Versehentliche Verwendung der geschützten Aminosäure
S237C	Cystein für Ligation
V286A	Synthese beginnend mit Valin-Linker zeigte eine schlechte Ausbeute (siehe Kapitel 3.1.3.1)

3.1.3 Probleme bei der Peptidsynthese und Ligation

3.1.3.1 Schlechte Kopplungsrate bei Val-Pam-Harzen

Die Kopplung des Val-Pam-Linkers an das Aminomethyl-Harz war insofern problematisch, als trotz doppelt durchgeführter Kopplung (zweite Kopplung 14 h über Nacht) des Val-Pam-Linkers immer noch Aminofunktionen am Harz mit dem Ninhydrin-Test nachweisbar waren. Die Kopplung des Val-Linkers scheint sterisch gehindert zu sein, da z.B. die Kopplung eines Alanin-Pam-Linkers immer vollständig ablief und danach keine Aminofunktionen mehr nachzuweisen waren. Da der Ninhydrin-Test sehr sensitiv ist, wurde angenommen, dass trotz des Nachweises von freien Aminofunktionen die Kopplungsrate groß genug war, mit diesem Harz eine Peptidsynthese durchzuführen. Die Synthese verlief normal, nur bei der Abspaltung zeigte sich, dass etwa die Hälfte des synthetisierten Produktes nicht vom Harz abzuspalten war. Dies deutete darauf hin, dass das Produkt nicht an den Pam-Linker synthetisiert wurde, sondern direkt an das Harz. Von dort lässt es sich nicht mehr abspalten. Die Synthese von Peptid 6 wurde bereits vor diesem Versuch mit käuflichem Val-Pam-Harz durchgeführt, auch dabei zeigte sich schon eine geringere Syntheseausbeute. Zu diesem Zeitpunkt wurde die geringe Ausbeute jedoch noch der Aminosäuresequenz des Peptides zugeschrieben. Die zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse zeigt, dass eine Synthese mit einem Val-Pam-Harz offenbar Probleme aufwirft. Bei den späteren Synthesen von Peptid 6 wurde daraufhin ein Ala-Pam-Harz verwendet und somit das C-terminale Valin durch ein Alanin ersetzt. Die Ausbeute dieser Synthese entsprach der erwarteten Menge an Rohpeptid. Diese Änderung der Aminosäuresequenz wurde nicht im Vorfeld bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Funktionalität von γ untersucht, da zu dem Zeitpunkt dieses Problem noch gar nicht

absehbar war. Es wurde erwartet, dass diese Sequenzänderung keine Auswirkungen hatte, da zum einen bis zu zwölf C-terminale Reste von γ ohnehin deletierbar sind (Müller, 2002)[34], zum anderen Alanin kleiner als Valin ist und insofern keine sterischen Probleme aufwerfen sollte.

3.1.3.2 Verunreinigte Boc-Aminosäure

Die erste Synthese von Peptid 6 lieferte zwar das gewünschte Produkt, aber stark verunreinigt. Anhand der Masse der Nebenprodukte konnten die Kopplungsschritte bestimmt werden, bei denen es zum Syntheseabbruch gekommen war. Es war immer ein Kopplungsschritt mit Asparagin. Die Nebenprodukte waren um 42 Da größer, als man anhand der Sequenz erwartet hätte, was eindeutig auf eine Verunreinigung der Boc-Aminosäure mit Essigsäure hinwies. Eine Kopplung in Gegenwart von Essigsäure führt unweigerlich zum Abbruch der Synthese, da die Essigsäure keine Aminofunktion enthält, mit der die Synthese fortgeführt werden könnte. Dies erklärt die definierten Abbrüche. In Tabelle 3.12 sind die Sequenzen und die Massen der drei identifizierten Syntheseprodukte aufgeführt.

Tabelle 3.12: Sequenzen und Massen identifizierter Produkte bei der Synthese von Peptid 6

Gefundene Produkte	*Sequenz der Produkte*	*Masse gemessen [kDa]*	*Masse errechnet [kDa]*
Abbruch 1	Essigsäurerest-KARQASITQELTEIVSGAAAV	2185,4	2185,4
Abbruch 2	Essigsäurerest-GGSLIKELQLVYNKARQASITQELTEIVSGAAAV	3602,0	3601,1
Peptid 6	CEQAARMVAMKAATDNGGSLIKELQLVYNKARQASITQELTEIVSGAAAV	5251,4	5251,0

Bereits eine Geruchsprobe identifizierte die Essigsäure eindeutig. Der Befund wurde durch ^{1}H-NMR (Nachweis der chemischen Verschiebung von 2,08 ppm) erhärtet. Auch der Hersteller konnte nicht umhin, sich dieser Meinung anzuschließen:

„Sehr geehrter Herr Wintermann, meine Kollegen haben heute morgen eine "Riechprobe" der beiden vorhandenen Chargen des Produktes Cat.no. 853007 Boc-Asn(Xan)-OH durchgeführt. Während die Charge S5372007 nur schwach nach Lösungsmittel riecht, war der Geruch nach Essigsäure bei der von Ihnen erhaltenen Charge S5117207 sehr deutlich wahrnehmbar...“ (e-mail der Firma Merck, Darmstadt, BRD, 24.02.2010).

3.1.3.3 Verunreinigung von Proben durch PEG-verunreinigtes Laufmittel

Bei den ersten Test-Ligationen zeigte sich bei der Analyse der Ligationsprodukte eine sehr starke Verunreinigung der Proben mit Polyethylenglycol (PEG). Das PEG machte sich durch sein charakteristisches Massenspektrum bemerkbar, einer Reihe von m/z Verhältnissen, die sich um jeweils 44 Da unterschieden, der Masse des PEG-Monomers. Die Verunreinigung war so stark, dass die Signale des PEG die Signale der gesuchten Produkte vollständig überdeckten (Abbildung 3-17).

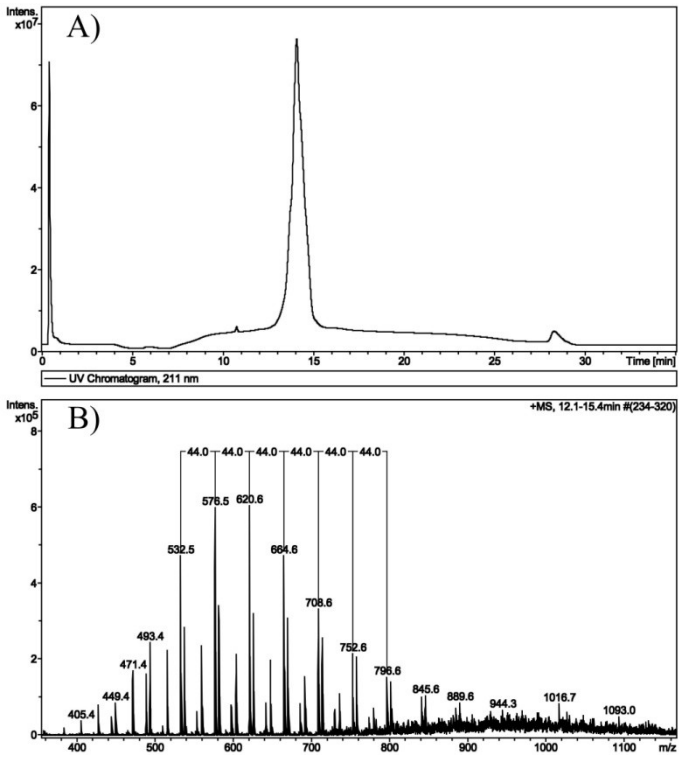


Abbildung 3-17: Verunreinigung einer Probe durch PEG

UV-Chromatogramm (211nm). Linearer Gradient von 0-100% Puffer B in 23 min bei RT. Puffer A : 0,1% TFA in 20% Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril. Das Massenspektrum zeigt das ESI-MS des Haupt-Peaks. Im Massenspektrum ist eindeutig die Verunreinigung der Probe durch PEG (Größe des Monomers: 44 Da) nachweisbar.

Die Verunreinigung stammte aus dem Acetonitril der chromatographischen Reinigung sowie aus Reaktionsgefäßen aus Plastik. Das chromatographische Abtrennen des PEG war nicht möglich, da die Retentionszeiten der Produkte und des PEG zu dicht beieinander lagen. Eine Chromatographie führte eher noch zur weiteren Anreicherung von PEG.

Die Verwendung höherwertigen Acetonitrils sowie der ausschließliche Einsatz von Reaktionsgefäßen aus Glas löste das Problem.

3.1.4 Diskussion (Peptidsynthesen und Ligationen)

Ausbeute(n)

Die Synthese der γ-Untereinheit war insgesamt bei allerdings enormem Aufwand und trotz einiger unvorhersehbarer Probleme erfolgreich. Die endgültige Ausbeute (etwa 30 µg) war nicht zuletzt wegen der dargestellten Probleme ausgerechnet im letzten Schritt minimal, jedoch immer noch ausreichend für die erforderliche Analytik. Die Gründe für die schlechte Ausbeute sind vielfältig und nicht nur technisch bedingt. So wurden die Synthesen und Ligationen nicht in einem darauf spezialisierten Peptidsynthese-Labor durchgeführt, das in der Regel deutlich besser mit den benötigten Geräten ausgestattet ist und darüber hinaus über mehr Erfahrungen in der Synthese verfügt, Erfahrungen, die im vorliegenden Fall erst noch gesammelt werden mussten.

Die Ausbeuten der Peptidsynthesen waren zwar nicht besonders groß, bewegten sich aber im angesichts der Peptidlänge erwarteten Bereich. Bei einer 0,4 mmol-Synthese ließen sich so je nach Peptid zwischen 50 und 100 mg reines Produkt isolieren. Die doch starke Unterschiedlichkeit der Peptidsyntheseprotokolle erstaunte. Im direkten Vergleich erwies sich das Protokoll aus Chicago bei gleicher Synthesequalität und Ausbeute als deutlich kostengünstiger und weniger zeitintensiv. So konnten die an einem Arbeitstag durchführbaren Kopplungen von ca. 8 auf mindestens 20 gesteigert werden. Damit dauerte eine Synthese nicht mehr bis zu 6 Tage, sondern nur noch 2 – 2,5 Tage.

Die Ligationen wurden erfolgreich durchgeführt und das gesuchte Endprodukt isoliert. Die Ligationsausbeuten waren in 3 von 5 Fällen sehr klein (siehe unten). Daneben erwies sich die Reinigung des entschützten Ligationsproduktes 3456 als problematisch. Dieses Produkt und das nun auch entschützte restliche Peptid 3 eluierten nur schlecht von der Chromatographiesäule. Dieser, möglicherweise durch die freien Cysteine ausgelöste Effekt, konnte auch nicht durch die Erhöhung der TCEP-Konzentration verhindert werden. Eine Lösung stellte die Reinigung von Ligationsprodukt 3456 in noch geschützter Form dar, gefolgt von Entschützen direkt im Ligationspuffer der nächsten Ligation. Der Grund für diese Auffälligkeiten blieb im Dunkeln. Das entschützte Produkt mit dem freien Cystein scheint hochaffin an das Säulenmaterial zu binden.

Da das Verfahren zum Entschützen des Cysteins direkt im nächsten Ligationspuffer ohne weiteres durchzuführen war, wurde das nächste Ligationsprodukt 23456 ebenfalls zuerst gereinigt und dann entschützt. Bei der Ligation dieses Produktes mit Peptid 1 zeigte sich jedoch, dass letzteres quantitativ mit dem Methoxyamin-Hydrochlorid (MAH) (dem Entschützungsreagenz), reagierte und daher nicht mehr ligierbar war. Die Reaktion an sich verwundert, da die THZ-Schutzgruppe des Cysteins und auch das

Entschützen im späteren Ligationspuffer wichtiger Bestandteil der sogenannten „*one-pot*“-Ligations-Strategie ist [22], bei der eine Chromatographie eingespart werden kann, da der Ligationsansatz zwischen zwei Ligationen nicht aufgereinigt werden muss. Dies funktioniert aber nur, wenn die erste Ligation möglichst quantitativ abläuft und MAH nicht mit dem Peptid der Folgeligation abreagiert. Der Grund für die Reaktion von Peptid 1 mit MAH ist nicht bekannt, er könnte in der Peptidsequenz liegen, da ein weiteres Peptid mit vergleichbarer Restezusammensetzung diese Auffälligkeit nicht zeigte.

Es ist nicht auszuschließen, dass die angewendete Ligationsmethode bei der vorliegenden Proteingröße schlicht an ihre Grenzen stößt. Abgesehen von den oben geschilderten Auffälligkeiten fiel die Effizienz der Ligationen ab der dritten Ligation, bei der das eine Edukt (Peptid 456) bereits 139 Reste lang war, deutlich ab. Der erwähnte Abfall der Ligationsausbeute auf maximal 10 % ab einer Länge von ~150 Resten könnte die üblicherweise erzielbare Proteingröße auf einen Bereich von nicht wesentlich mehr als etwa 300 Reste begrenzen.

Es fragt sich auch, ob die *reversed phase* HPLC großer Ligationsprodukte nicht zur dauerhaften Bindung an die Matrix und somit zum schleichenden Verfall der Säulen führt, ausgeprägter, als dies ohnehin der Fall ist. Als Ausweg wären Ionenaustausch-Chromatographie oder eine Gelfiltration der großen Produkte denkbar, wobei allerdings in beiden Fällen anschließend die verwendeten Puffersalze entfernt werden müssten, was einen weiteren Reinigungsschritt nötig machen würde. Es bleibt offen, inwieweit dies insgesamt das bessere Ergebnis liefert. Zumindest würde es deutlich länger dauern, da über *reversed phase* HPLC gereinigte Produkte nur gefriergetrocknet werden müssen und dann sofort für die nächste Ligation verwendbar sind.

Die Anforderungen an die Reinheit der verwendeten Chemikalien sind hoch. Das beinhaltet eine weitere Fehlerquelle, da beispielsweise die Aminosäuren nach eigener Erfahrung mit Essigsäure verunreinigt sein können. Diese Verunreinigung war eindeutig und konnte relativ leicht nachgewiesen werden, wobei festzuhalten bleibt, dass das Riechen an Chemikalien keinesfalls übliche Praxis ist und auch nicht sein sollte. Daneben sind aber auch weitere Verunreinigungen denkbar, die versteckt im Hintergrund das Syntheseergebnis negativ beeinflussen, sich jedoch nicht so eindeutig auswirken. Andererseits liegen Eingangsanalysen, wie sie in der Industrie üblich sind, klar jenseits der Möglichkeiten von Hochschullaboren. Selbst bei speziell für HPLC-Anwendungen ausgewiesenen Lösungsmitteln kommt es offenbar vor, dass geringfügig verunreinigte Chargen ausgeliefert werden. Meist dürften derartige Verunreinigungen nicht besonders auffallen, da sie unterhalb der Nachweisgrenzen liegen und andere Retentionszeiten als die zu reinigenden Produkte haben. Im geschilderten Fall hatte die PEG-Verunreinigungen leider die gleiche Retentionszeit wie das zu reinigende Ligationsprodukt. Daher sammelte sich schon beim Äquilibrieren der Säule das PEG an

und eluierte zusammen mit dem Produkt. Bei Mehrfachchromatographien verschärfte sich das Problem noch.

Die in Biochemielaboren übliche Verwendung von Labor- und Reaktionsgefäßen aus Kunststoff kann im Peptidsyntheselabor Probleme verursachen, da Kunststoffe Weichmacher und andere Plastik-Additive freisetzen können. Es empfiehlt sich daher die Verwendung von Glas. Wenn das nicht o.w. möglich ist, sollten die Kontaktzeiten der Probe und der verwendeten Chemikalien mit dem Kunststoff möglichst gering gehalten werden. Lange Ligationen wurden daher in Reaktionsgefäßen aus Glas, nicht aus Plastik, durchgeführt.

Die schlechten Ausbeuten der letzten Ligationen mögen auch durch die Verwendung zu sehr gealterter HPLC-Säulen hervorgerufen worden sein. Zwischen den einzelnen Chromatographien wurden die Säulen zwar ausgiebig gewaschen, aber trotzdem auf der Säule verbliebene Probenkontaminationen könnten zum allmählichen Absinken der Reinigungseffizienz der HPLC-Säulen (wie im Grunde aller Chromatographiesäulen) geführt haben. Es wäre sicher besser gewesen, wenn die Säulen regelmäßig nach einer festen Anzahl von Chromatographien mindestens mit neuen Füllungen ausgestattet worden wären. Optimal, wenngleich nicht kostengünstig, wäre die Zuweisung einer dedizierten Säule zu jeder Peptidreinigung und jeder Ligation.

Zusammenfassung

Die Aufteilung der 286 Reste langen γ-Untereinheit in sechs einzelne Peptide war zielführend. Die Peptidsynthesen zeigten keine Probleme durch schwierig zu synthetisierende Aminosäuresequenzen. Die eingeführten Cysteine waren mit der biologischen Aktivität von γ kompatibel. Aufgrund dieser auf Anhieb positiven Ergebnisse wurden keine Versuche unternommen, durch Veränderungen der Position der Cysteine ggf. das Syntheseergebnis (auch des gesamten Proteins) zu verbessern, was angesichts des hohen präparativen Aufwands auch kaum möglich gewesen wäre.

Die Peptidsynthesen lieferten trotz der beträchtlichen Ausbeuteverluste letztlich die benötigten Mengen problemlos, sie waren sicher nicht limitierend. Der größte limitierende Faktor waren die Verluste bei den Ligationen, insbesondere der drei letzten, wo die Ausbeuten bei höchstens 10 % lagen. Um diese enormen Verluste zu verringern, könnte man zum einem die Länge der Peptide vergrößern. Das würde sicher in schlechteren Peptidsyntheseausbeuten resultieren (die man durch Materialeinsatz kompensieren könnte), aber mindestens eine Ligation und die dabei auftretenden

Verluste einsparen. Falls jedoch die Eduktlänge begrenzend wirkt, würde ein solcher Ansatz keine Verbesserung bringen. Letztlich kann das nur experimentell geklärt werden. Zum anderen könnte die konvergente Ligationsstrategie [23,24] hilfreich sein. Dabei wird das Protein zunächst in zwei etwa gleich großen Teilen mittels nativer chemischer Ligation ligiert und dann diese beiden Teile zum Volllängen-Protein. Die maximale Länge der bei den ersten Ligationen eingesetzten Peptide ist bei diesem Ansatz kleiner, die Ausbeuten dadurch möglicherweise größer. Allerdings wären dann zuletzt gleich zwei etwa 140-Reste-enthaltende Peptide miteinander zu ligieren, ein angesichts der vorliegenden Daten ambitioniertes Unterfangen.

3.2 Präparationen der nativen Untereinheiten

3.2.1 Präparation der EF_1-ATPase

Für die Präparation der Untereinheiten musste zunächst EF_1 selbst präpariert werden. Die Präparation erfolgte durch das an Wise angelehnte [35], im Labor standardmäßig durchgeführte Protokoll. Die Vorgehensweise ist im Flussdiagram in Abbildung 3-18 zusammengefasst.

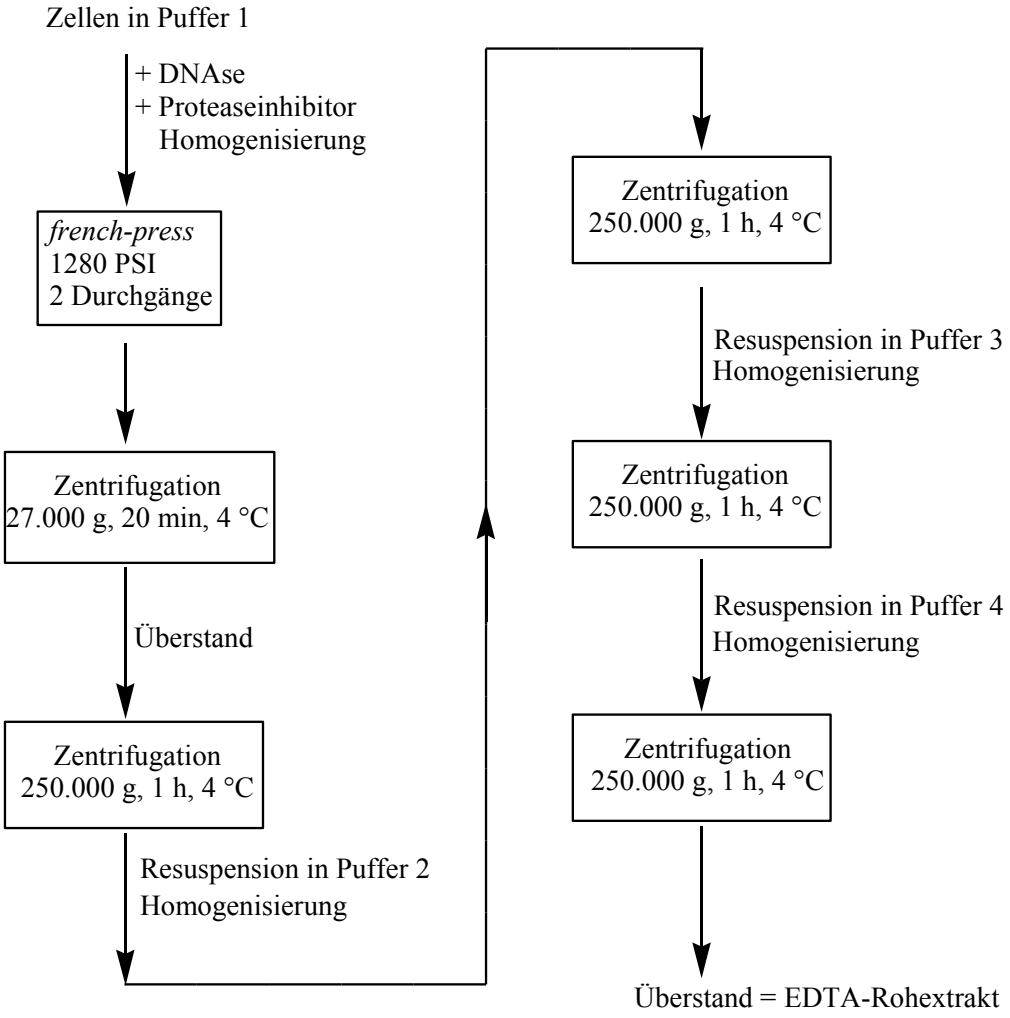


Abbildung 3-18: Flussdiagram der EF_1-Präparation

Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Schritte findet sich im Methodenteil.

Der so gewonnene EF_1-haltige EDTA-Rohextrakt wurde durch Anionen-Austauschchromatographie an Tosoh Fractogel TSK-DEAE 650(S) unter Stufenelution weiter gereinigt. Das durch 30% Puffer B eluierte EF_1 wird im weiteren „DEAE-EF_1“ genannt. Abbildung 3-19 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm dieser Anionen-Austauschchromatographie.

Das DEAE-EF_1 wurde anschließend vermittels seines His-*tag* über Ni-NTA-Metallchelatchromatographie weiter aufgereinigt und gleichzeitig konzentriert. Das Eluat dieser Chromatographie wird im weiteren „Ni-NTA-EF_1“ genannt. Zu bestimmten Zwecken (s.u.) wurde das Eluat der Anionen-Austauschchromatographie direkt auf eine Ni-NTA-Säule gegeben und dort entsprechend eluiert (AAC - Ni-NTA-Tandem). Abbildung 3-20 zeigt das Chromatogramm einer Ni-NTA-Chromatographie.

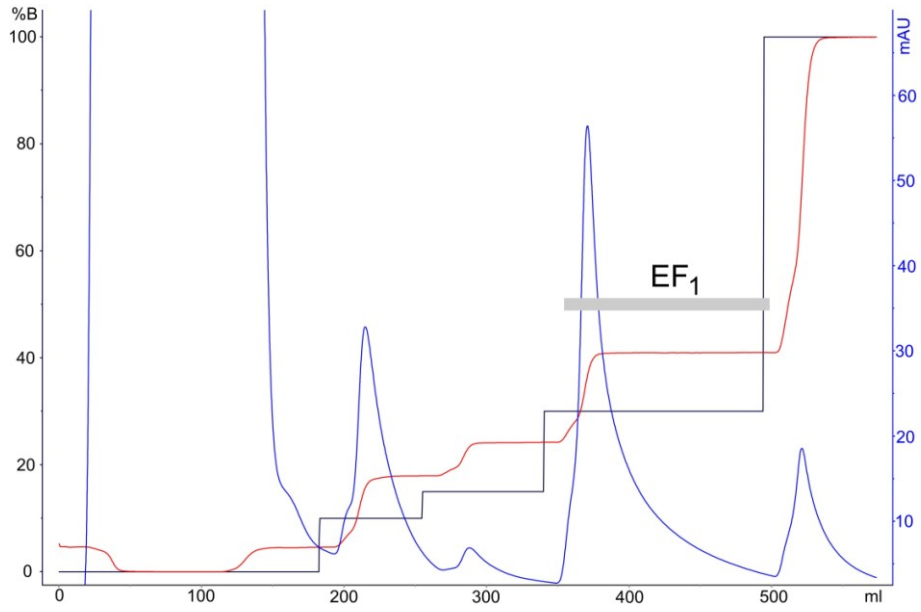


Abbildung 3-19: Anionen-Austauschchromatographie mit dem EDTA-Rohextrakt

Blau: A_{280} [mAU]; rot: Leitfähigkeit [mSiemens]; schwarz: Konzentration von Puffer B [%]. Matrix: Tosoh Fractogel TSK-DEAE 650(S); Probevolumen 100 ml; Elutionsgeschwindigkeit: 5 ml/min; Stufen-Elution mit 10, 15, 30, und 100 % Puffer B. Puffer A : 50 mM Tris/HCl; 10% (v/v) MeOH (pH 7,4). Puffer B : 50 mM Tris/HCl; 10% (v/v) MeOH; 500 mM Na_2SO_4 (pH 7,4)

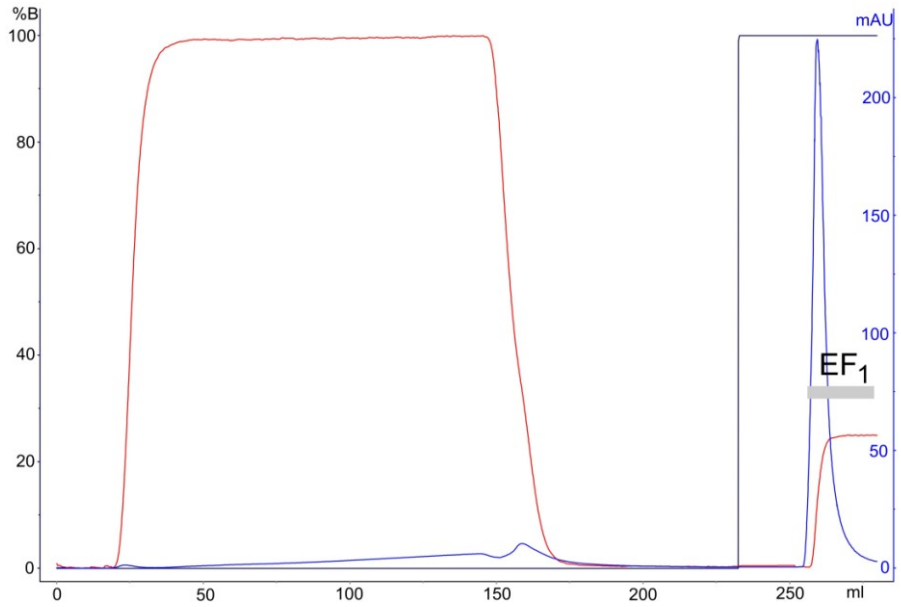


Abbildung 3-20: Ni-NTA-Chromatographie von DEAE-EF_1

Blau: A_{280} [mAU]; rot: Leitfähigkeit [mSiemens]; schwarz: Konzentration von Puffer B [%]. Matrix: Ni-NTA Superflow; Probevolumen 100 ml; Elutionsgeschwindigkeit: beim Spülen 5 ml/min, bei der Elution 1 ml/min; Puffer A : 20 mM Tris/HCl; 50 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$; 10% (v/v) Glycerin; 20 mM Imidazol (pH 7,5). Puffer B : 20 mM Tris/HCl; 50 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$; 10% (v/v) Glycerin; 150 mM Imidazol (pH 7,5)

Die Reinheit des präparierten EF_1 wurde mittels SDS-Elektrophorese bestimmt. Die Elektrophorese verdeutlicht (Abbildung 3-21), dass die Ni-NTA-Chromatographie die Reinheit des EF_1 deutlich verbesserte, was angesichts der Tatsache, dass es sich dabei um eine Affinitätschromatographie handelt, nicht verwundert. Bis auf Untereinheit δ sind die vier anderen EF_1-Untereinheiten (α, β, γ, ε) im Gel sichtbar. δ geht während der Aufreinigung annähernd quantitativ verloren, ein bekannter Nebeneffekt der Reinigung [36]. Die α- und β-Untereinheiten sind im Ni-NTA-EF_1 im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 vorhanden. Dies ist ein Indiz für die Intaktheit des Komplexes. Da sich der His-*tag* nur an der β-Untereinheit befindet, sollte die Menge dieser Untereinheit im Vergleich zur α-Untereinheit größer sein, falls das EF_1 teilweise in seine Untereinheiten zerfallen wäre.

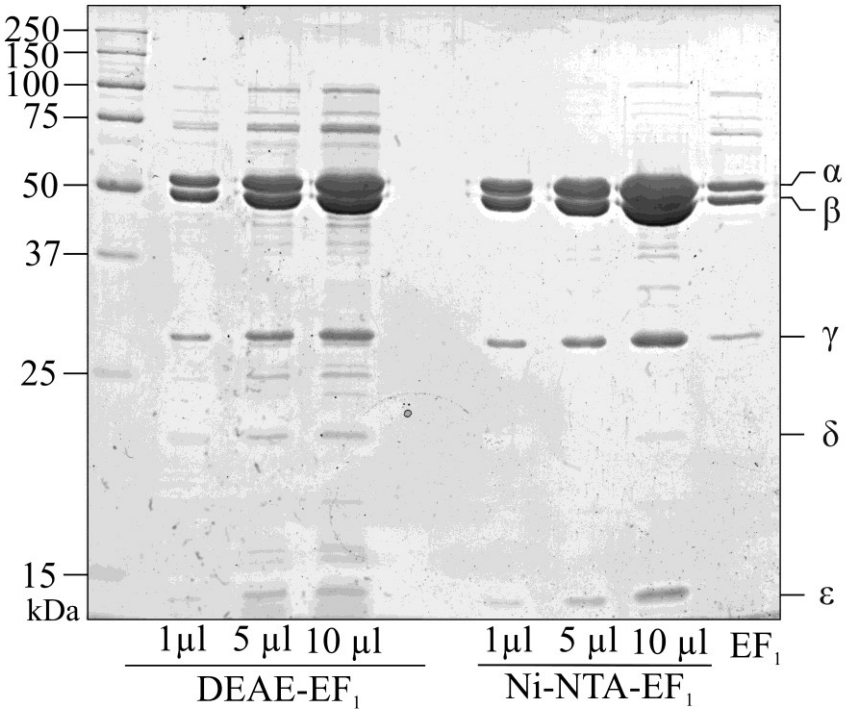


Abbildung 3-21: SDS-PAGE mit gereinigten EF_1-Proben

SDS-PAGE (12,5%) in Gegenwart von 0,1% (w/v) SDS; Coomassie R-250 Anfärbung. Aufgetragen wurde EF_1 nach Reinigung über DEAE (30% Puffer B Peak) sowie nach Ni-NTA-Chromatographie (Ni-NTA-Eluat). Es wurden jeweils verschiedene Volumina der Proben mit unbekannter Konzentration aufgetragen. M = Bio-Rad Precision Plus Protein unstained standard; EF_1 = EF_1-Standard.

3.2.2 Dissoziation von EF_1

Zur Präparation der einzelnen EF_1-Untereinheiten musste EF_1 dissoziiert werden. Dazu wurden drei verschiedene Methoden jeweils mit DEAE-EF_1 als Startmaterial ausprobiert. Im ersten Versuch wurde EF_1 mit Ammoniumsulfat gefällt, im Dissoziationspuffer (mit 800 mM LiCl) [37] gelöst und dann gegen den Dissoziations-puffer zum Entfernen des restlichen Ammoniumsulfats gelfiltriert. Im zweiten Versuch wurde DEAE-EF_1 direkt gegen den Dissoziationspuffer dialysiert. Im dritten Versuch wurde Ni-NTA-EF_1 gegen den Dissoziations-Puffer gelfiltriert. Danach wurden diese drei Proben einem zweifachen Frier/Tau-Zyklus (-20 °C/0 °C) unterzogen und anschließend an Ni-NTA chromatographiert. Ein Flussdiagramm dieser Experimente ist in Abbildung 3-22 zu sehen.

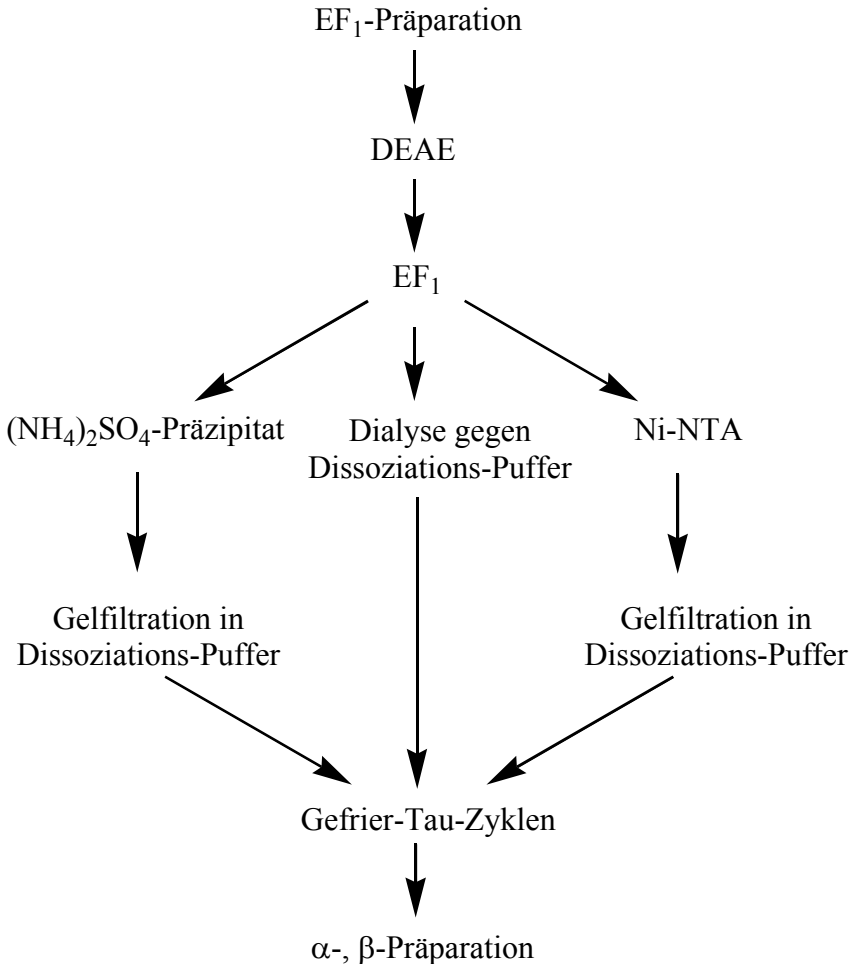


Abbildung 3-22: Ablauf der Dissoziations-Experimente

In diesen Versuchen zeigte sich, dass ein Ammoniumsulfat-gefälltes EF_1 innerhalb eines Monates in die Untereinheiten zu zerfallen begann. Abbildung 3-23 zeigt die Fraktionen einer Ni-NTA-Chromatographie von derart gefälltem EF_1. Mit intaktem EF_1 würde man erwarten, dass der Durchlauf allenfalls geringe Mengen an Verunreinigungen enthält und das intakte EF_1 quantitativ durch Imidazol eluiert wird. Es zeigte sich jedoch, dass im Durchlauf ein Großteil von Untereinheit α und signifikante Mengen an γ enthielt, während das Imidazol-Eluat den Großteil von β und nur noch geringe Mengen der anderen Untereinheiten enthielt. Somit war das EF_1 zumindest teildissoziiert. Das war verwunderlich, da die Fällung mit Ammoniumsulfat an sich ein Standardverfahren zur Proteinlagerung bzw. Konzentrierung ist. Allerdings ist auch bekannt, dass EF_1 – wie viele heterooligomere Proteinkomplexe kältelabil ist und bei 4 °C in Lösung leicht dissoziiert und dann ausfällt [38]. Daneben deuten die zusätzlichen niedermolekularen Banden auf ein gewisses Maß an Proteolyse.

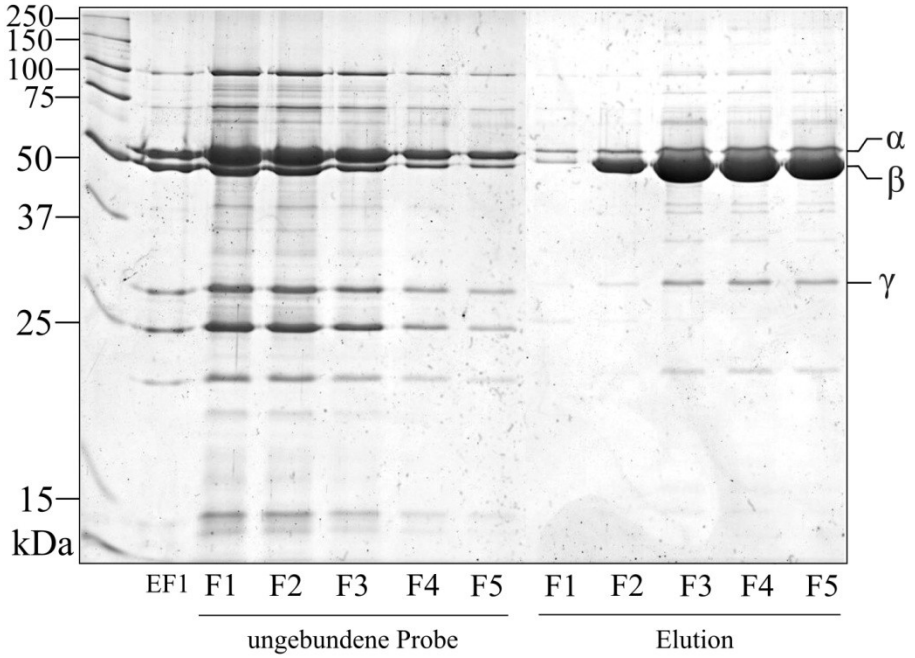


Abbildung 3-23: SDS-PAGE mit Fraktionen einer Ni-NTA-Chromatographie des gealterten EF_1-Präzipitats

SDS-PAGE (12,5%) in Gegenwart von 0,1% (w/v) SDS; Coomassie R-250 Anfärbung. Aufgetragen wurde die Fraktionen der an Ni-NTA ungebundenen Probe, sowie die Fraktionen der der Elution.

Mit den aus Ammoniumsulfat-gefälltem EF_1 präparierten Untereinheiten konnte in späteren Versuchen keine erfolgreiche Rekonstitution durchgeführt werden. Die Gründe, aus denen der Zerfall stattfand, wurden nicht weiter verfolgt. Im Hinblick auf diese Befunde erfolgten die späteren Versuche zur Dissoziation/Rekonstitution nur noch mit frischem, ungefälltem Material.

Ein Vergleich von Dialyse und Gelfiltration ergab Folgendes: Eine Probe des EF_1 wurde über Nacht bei 4 °C gegen Dissoziationspuffer mit 800 mM LiCl dialysiert. Eine weitere Probe wurde durch Ni-NTA-Chromatographie konzentriert und dann gegen denselben Dissoziationspuffer gelfiltriert. Beide Proben wurden dann dem zweifachen Frier/Tau-Zyklus (-20°C und 0°C) unterzogen. Die anschließende Ni-NTA-Chromatographie zeigte den jeweiligen Erfolg der EF_1-Dissoziation auf.

Abbildung 3-24 zeigt, dass beide Verfahren zu einer nahezu quantitativen Dissoziation des EF_1 führten. Die Reinheit der Probe, die mit Hilfe der Gelfiltration in den Dissoziationspuffer überführt worden wurde, war deutlich besser, was an der zusätzlichen Ni-NTA-Chromatographie gelegen haben dürfte.

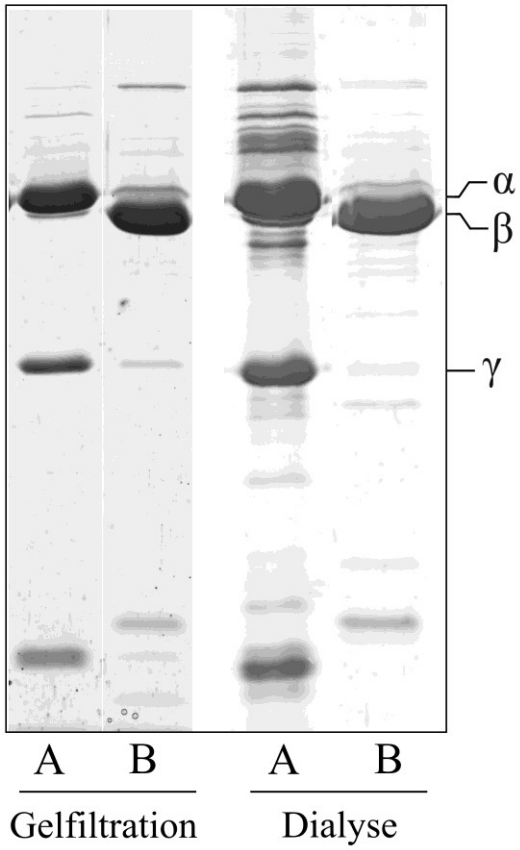


Abbildung 3-24: SDS-PAGE mit Fraktionen der Ni-NTA-Chromatographien der gelfiltr. und dialys. Probe

SDS-PAGE (12,5%) in Gegenwart von 0,1% (w/v) SDS; Coomassie R-250 Anfärbung. Aufgetragen wurden die Fraktionen der an Ni-NTA ungebundenen Probe (A), sowie die Fraktionen der Elution (B) der beiden Dissoziationsversuche.

Da die Dialyse im Vergleich zur Ni-NTA-Chromatographie mit anschließender Gelfiltration deutlich zeitaufwendiger war und ein schlechteres Produkt erzeugte, wurde sie nicht weiter verfolgt. Bei allen weiteren Versuchen wurde das EF_1 direkt nach der Präparation mittels Ni-NTA-Chromatographie aufkonzentriert und danach sofort in den Dissoziationspuffer mit 800 mM LiCl überführt. LiCl erwies sich in vergleichenden Experimenten (Lars Langemeyer, Diplomarbeit & persönliche Mitteilung) als dem in der Originalarbeit [39] verwendeten $NaNO_3$ als überlegen.

3.2.3 Präparation der Untereinheiten α und β

Als Nächstes mussten die dissoziierten Untereinheiten aus dem Dissoziationsansatz isoliert werden. Da die β-Untereinheit einen N-terminalen His-*tag* enthielt, wurde zuerst eine Ni-NTA-Chromatographie mit dem Dissoziationsansatz durchgeführt. Im Durchlauf befand sich erwartungsgemäß die ungebundene α-Untereinheit und im Imidazol-Eluat die β-Untereinheit. Abbildung 3-25 zeigt das Chromatogramm dieser Ni-NTA-Chromatographie.

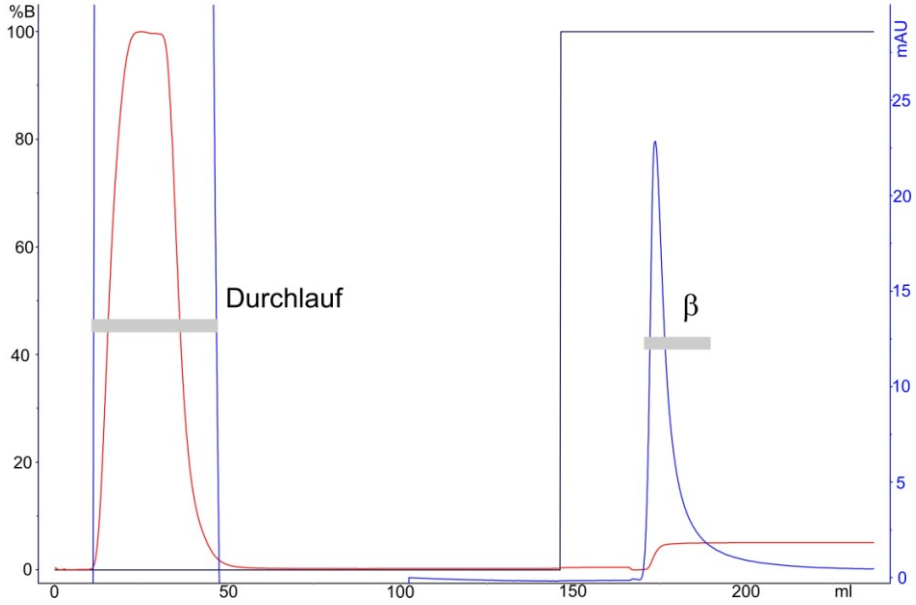


Abbildung 3-25: Ni-NTA Chromatographie mit dissoziiertem EF_1

Blau: Extinktion E_{280} [mAU]; rot: Leitfähigkeit [mSiemens]; schwarz: Konzentration Puffer B [%]. Säulenmaterial: Ni-NTA Superflow; Säulenvolumen 5 ml; Probevolumen ca.30 ml; Elutionsgeschwindigkeit 5 ml/min. Beim Wechsel auf 100 % Elutions-Puffer (Puffer B) eluierte die gebundene β-Untereinheit. Die α-Untereinheit befand sich im Durchlauf. Puffer A : 20 mM Tris/HCl; 50 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$; 10% (v/v) Glycerin; 20 mM Imidazol (pH 7,5). Puffer B : 20 mM Tris/HCl; 50 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$; 10% (v/v) Glycerin; 150 mM Imidazol (pH 7,5).

Zur Präparation der α-Untereinheit wurde der Durchlauf der Ni-NTA-Chromatographie über eine Hydroxylapatit-Chromatographie weiter aufgereinigt [39]. Durch die Auswahl geeigneter Phosphatkonzentrationen (0, 40, 100 % B) war es möglich, die α-Untereinheit von Resten der β- und der γ-Untereinheiten zu trennen. α eluierte bei ca. 40% Puffer B, die γ-Untereinheit bei 100 % Puffer B. Abbildung 3-26 zeigt das Chromatogramm einer Hydroxylapatit-Chromatographie.

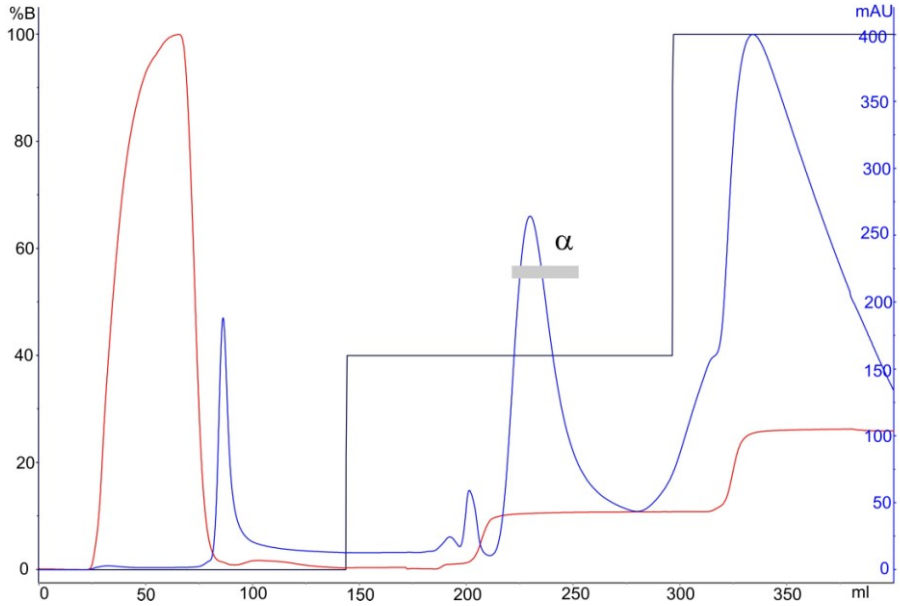


Abbildung 3-26: Hydroxylapatit-Chromatographie mit dissoziiertem EF_1 nach Ni-NTA Chromatographie

Blau: A_{280} [mAU]; rot: Leitfähigkeit [mSiemens]; schwarz: Konzentration Puffer B [%]. Matrix: Bio-Gel HTP; Säulenvolumen ca. 30 ml; Probevolumen ca. 60 ml; Elutionsgeschwindigkeit 5 ml/min.; Stufengradient: 40 % und 100 % Puffer B. Der markierte Peak enthält die α-Untereinheit. Puffer A : 50 mM Tris/HCl; 0,1 mM EDTA: 0,1 mM DTT (pH 8,0). Puffer B : 50 mM Tris/HCl; 0,1 mM EDTA: 0,1 mM DTT; 50 mM K_2HPO_4 (pH 8,0)

Für die folgenden Rekonstitutionsversuche wurden die α- und β-Untereinheiten per Ultrafiltration auf ca. 0,2 bis 1,0 mg/ml konzentriert. In der Literatur [39] ist eine Löslichkeitsgrenze von 0,7 mg/ml für die α-Untereinheit angegeben. Für die β-Untereinheit liegt die Löslichkeitsgrenze deutlich höher. Das SDS-Gel mit den beiden jeweils vereinigten und konzentrierten Proben (Abbildung 3-27) zeigt, dass die α-Untereinheit sehr gut aufgereinigt wurde, wohingegen β noch merkliche Verunreinigungen enthielt, u.a. auch geringe Mengen von γ.

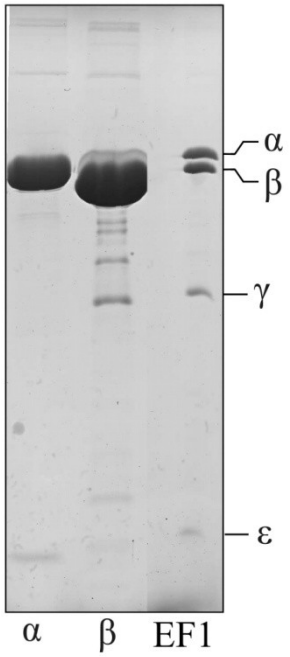


Abbildung 3-27: SDS-PAGE mit den gereinigten Untereinheiten

SDS-PAGE (12,5%) in Gegenwart von 0,1% (w/v) SDS; Coomassie R-250 Anfärbung. Aufgetragen wurden die vereinigten Fraktionen der Ni-NTA- und der Hydroxylapatit-Chromatographie, von α- und β jeweils ca. 10 µg. EF_1 = EF_1-Standard.

In Abbildung 3-28 sind Immundekorationen der gereinigten Untereinheiten α und β sowie von EF_1 mit Antikörpern gegen die einzelnen Untereinheiten α, β und γ gezeigt. Die Identität der α- und β-Untereinheiten wird bestätigt. α enthielt kein γ, β Spuren davon. Die Verunreinigung von β im Vergleich zu α könnte durch unvollständig dissoziiertes EF1 bedingt sein.

Zudem wurde α zweimal chromatographiert, β nur einmal. Eine Nachreinigung der β-Untereinheit unterblieb im Hinblick auf den zu erwartenden Ausbeuteverlust. Die leichte Verunreinigung mit γ könnte darüber hinaus auch durch das später beobachtete Fällungsverhalten von β + γ (nicht jedoch α + γ, s.u.) bedingt sein. In jedem Fall reichte das in der β-Präparation enthaltene γ nicht für eine messbare Rekonstitution von „Rumpf-EF1“ ((αβ)3γ), wie entsprechende Kontrollen eindeutig zeigten (siehe weiter unten).

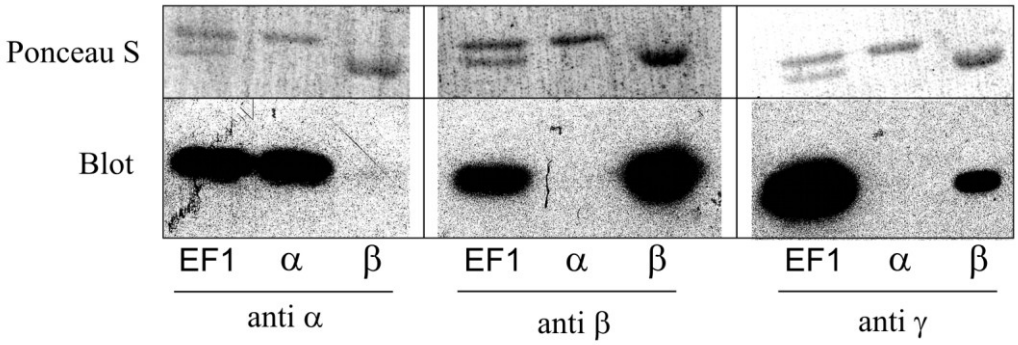


Abbildung 3-28: Immundekoration der präparierten Untereinheiten

Western Blot der Untereinheiten mit entsprechenden Antikörpern. Als Positivkontrolle diente EF1. Die Bilder in der oberen Reihe zeigen die mit Ponceau S angefärbten, auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine. Die Bilder in der unteren Reihe zeigen die entsprechenden Ausschnitte aus dem entwickelten Film.

3.2.4 Präparation von Untereinheit γ

Da die bei der Hydroxylapatit-Chromatographie des Dissoziations-Ansatzes erhaltene Menge der γ-Untereinheit zu gering und die Reinheit nicht ausreichend war, musste γ anders präpariert werden. Dazu war γ im Vorfeld kloniert und der resultierende Vektor pGH12 (γ aus KH4 in pET16b) in *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert worden [40]. Die Induktion erfolgte mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Die überexprimierte γ-Untereinheit bildete Einschlußkörper, die sich durch Zellaufschluß und Zentrifugation in einem weißlichen Pellet abtrennen ließen. Dieses Pellet wurde in einem Puffer mit 6 M GdnHCl aufgelöst, gegen 8 M Harnstoff-Puffer gelfiltriert und dann mittels Kationen-Austausch-Chromatographie gereinigt. Details der Aufreinigung finden sich im Methodenteil.

Abbildung 3-29 zeigt das Chromatogramm der Kationenaustausch-Chromatographie, Abbildung 3-30 eine SDS-PAGE mit den Fraktionen dieser Chromatographie. Es ist ersichtlich, dass sich die γ-Untereinheit unter den gewählten Chromatographie-Bedingungen sehr gut reinigen ließ. Verunreinigungen waren nur in Spuren sichtbar. Abbildung 3-31 zeigt eine HPLC-MS-Analyse mit gereinigtem γ.

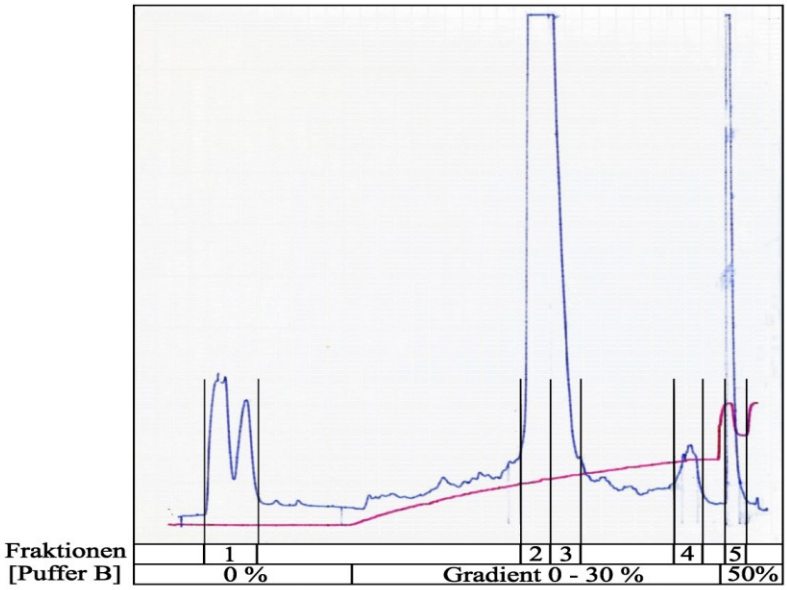


Abbildung 3-29: Kationenaustausch-Chromatographie mit überproduziertem γ

Blaue Linie: A_{280} [mAU]; rote Linie: Leitfähigkeit [mSiemens]. Säule : 5 ml HiTrap-SP-HP; Probenvolumen 21 ml; Elutionsgeschwindigkeit 3 ml/min. Gradient 0-30 % Puffer B in 150 ml Gesamtvolumen. Das γ eluierte im Bereich zwischen 16,5 und 20 % Puffer B und wurde in zwei Fraktionen aufgeteilt (Fraktion 2 und 3). Puffer A : 20 mM MES/NaOH; 8 M Harnstoff; 1 mM EDTA; 0,1 mM DTT (pH 6). Puffer B : 20 mM MES/NaOH; 8 M Harnstoff; 1 mM EDTA; 0,1 mM DTT; 1 M NaCl (pH 6).

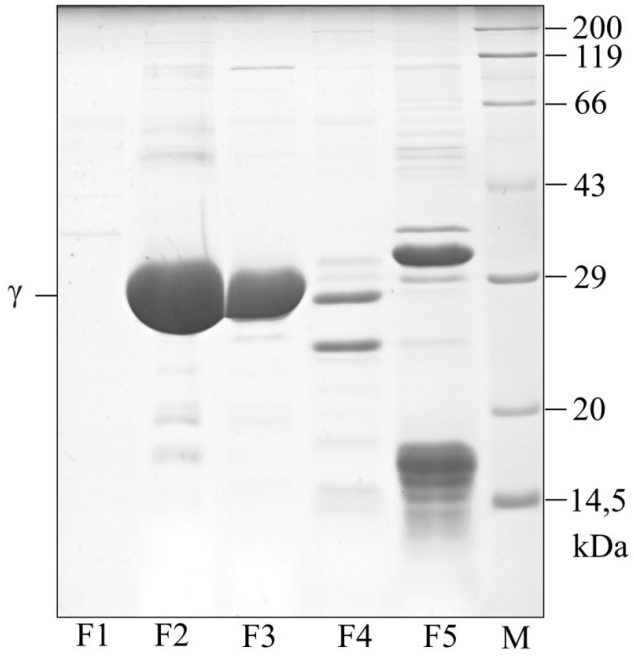


Abbildung 3-30: SDS-PAGE von Fraktionen aus der γ-Aufreinigung

SDS-PAGE (12,5 %) in Gegenwart von 0,1 % (w/v) SDS; Coomassie R-250 Anfärbung. Aufgetragen wurden die Fraktionen 1–5 der Kationen-Austausch-Chromatographie des mit pGH12 überproduzierten γ. M = Standard.

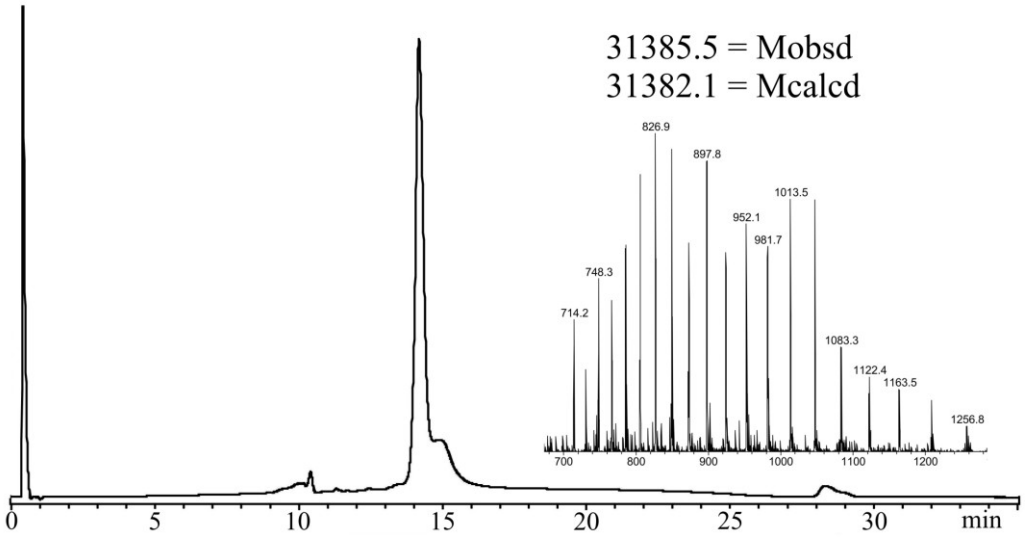


Abbildung 3-31: Analytische HPLC-MS mit gereinigtem γ

UV-Chromatogramm (211 nm). Linearer Gradient von 0-100% Puffer B in 23 min bei RT. Puffer A : 0,1% TFA in 20% Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril. Die Massenberechnung erfolgte mit den durchschnittlichen Isotopenmassen. Mobsd = gemessene Masse, Mcalcd = berechnete Masse.

3.2.4.1 CD-spektroskopische Untersuchung der γ-Untereinheit

Da die überexprimierte γ-Untereinheit in Puffer mit 6 M GdnHCl gelöst war und folglich nur denaturiert vorlag, wurde überprüft, ob sie durch Entfernen des GdnHCl renaturierbar war. Dies war wesentlich für die geplante chemische Totalsynthese, da auch diese in 6 M GdnHCl stattfinden musste. Die entsprechende Messung erfolgte CD-spektrometrisch.

Für die Analyse wurde die in Guanidin-Puffer gelöste γ-Untereinheit zur Entfernung des Guanidins gegen Phosphatpuffer gelfiltriert.

Da es bei Rückfaltungen meist auch zur Bildung irreversibel ausfallender Präzipitate kommt, wurde die Probe vor der Messung zentrifugiert (1h, 100.000 x g, 4 °C). Nach Proteinbestimmung wurde der Überstand dann im CD-Spektrometer vermessen.

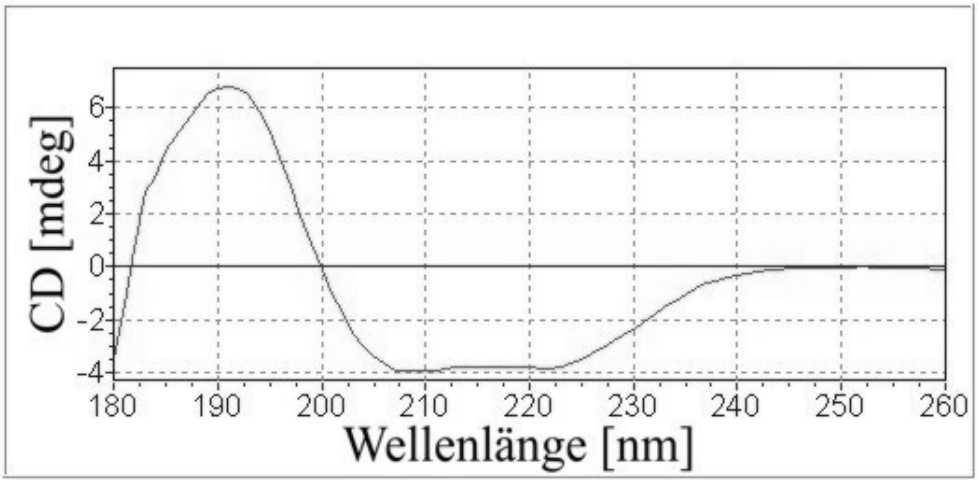


Abbildung 3-32: CD-Spektrum der renaturierten γ-Untereinheit

Die Abbildung zeigt das CD-Spektrum der gereinigten renaturierten γ-Untereinheit ([mdeg] in Abhängigkeit von der Wellenlänge [nm]).

Das gemessene CD-Spektrum (Abbildung 3-32) wurde mit dem Algorithmus von Raussens [41] ausgewertet. Die Sekundärstrukturanteile von *E. coli* γ wurden mit Hilfe der 3D-Strukturdaten des Datensatzes pdb: 3oaa[13] von www.pdb.org und dem Programm YASARA [3] berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.13 zusammengefasst.

Tabelle 3.13: Gemessene und errechnete Sekundärstrukturanteile

Typ	*Raussens-Algorithmus*	*YASARA-Berechnung*
alpha helix	43,0 %	60,2 %
beta-sheet	14,5 %	13,7 %
turn	12,5 %	3,5 %
random	30,0 %	22,5 %

Die Ergebnisse sind zum Teil übereinstimmend, aber nicht identisch. Die Gründe für die Unterschiede sind vielfältig, sie sind im Methodenteil näher aufgeführt. Hinsichtlich der vorliegenden Arbeit bleibt festzuhalten, dass renaturiertes γ zu einem erheblichen Teil α-helikal war. Da zudem die Ausbeuteverluste durch irreversible Fällung nach Entfernen des GdnHCl gering waren, wurde gefolgert, dass γ gut renaturierbar ist und die Unterschiede zwischen berechnetem und gemessenem Anteil an α-Helix auf Fehler der Proteinbestimmung und Unzulänglichkeiten der CD-Auswertealgorithmen zurückgingen. Dieser Schluss wurde durch die erfolgreiche Rekonstitution untermauert (s.u.).

3.2.5 Diskussion

Die Präparation der drei Untereinheiten α, β und γ der *E. coli* ATPase war erfolgreich. α und γ waren sauberer als Untereinheit β, was wahrscheinlich verfahrenstechnische Gründe hatte. Eine geringe Verunreinigung von β mit γ war misslich im Hinblick auf den späteren Verwendungszweck der Untereinheiten, aber tolerabel, da die Rekonstitution von Rumpf-EF_1 unzweifelhaft separat zugesetztes γ erforderte.

Die generelle Vorgehensweise bei der Dissoziation/Rekonstitution des EF_1 folgte zwar den Protokollen in der Arbeit von Dunn & Futai [39], die genaue Anwendung führte aber nicht zum gewünschten Erfolg. Die Gründe dafür liegen im Dunkeln, sie wurden nicht weiter untersucht. Stattdessen wurde der an den drei β-Untereinheiten N-terminal vorliegende His-*tag* vorteilhaft verwendet und außerdem ein anderes Chaotrop zur Dissoziation eingesetzt. Da die γ-Untereinheit nicht in ausreichender Menge und Reinheit aus dem Dissoziationsansatz isoliert werden konnte, wurde sie separat in *E. coli* überexprimiert. Durch die Reinigung der Protein-Einschlußkörper, die bei der Überproduktion entstanden, konnte mit ca. 30 mg eine mehr als ausreichende Menge von γ sehr rein isoliert werden. Die Lagerung dieser Präparation in 6 M GdnHCl bei -20 °C war problemlos, ebenso die Rückfaltung von γ nach Entfernen des Chaotrops. Ein Verlust der biologischen Aktivität (nach Rekonstitution) war auch nach mehr als zwei Jahren Lagerung nicht feststellbar.

Im Gegensatz dazu war die Lagerfähigkeit des EF_1 und vor allem der gereinigten Untereinheiten α und β sehr schlecht. Dieses Problem konnte dadurch umgangen werden, dass EF_1 sofort nach Präparation gegen den Dissoziationspuffer gelfiltriert und dann eingefroren wurde. Bei den isolierten Untereinheiten α und β war keine längere andauernde Lagerung möglich. Sie verloren ihre Rekonstituierbarkeit sowohl bei einer Lagerung bei 4 °C als auch bei –80 °C (in Gegenwart von 20 oder 70 % Glycerin). Damit blieb nur die jeweils frische Präparation dieser beiden Untereinheiten vor jeder Rekonstitution. Das Zeitfenster für eine erfolgreiche Rekonstitution betrug maximal 3 Tage, unter deutlicher Abnahme der Aktivität mit der Zeit von anfangs ca. 100 U/mg auf ca. 30 U/mg am dritten Tag. Über die Gründe für dieses Verhalten kann nur spekuliert werden. Die Diskussion dieser Frage wird bei den Rekonstitutions-ergebnissen weiter unten wieder aufgenommen.

3.3 Rekonstitution von *Rumpf-EF$_1$ ($\alpha_3\beta_3\gamma$)*

3.3.1 Rekonstitution mit nativem γ

Im Hinblick auf die außerordentlich aufwendige Totalsynthese der γ-Untereinheit musste zunächst überprüft werden, ob EF_1 überhaupt aus den Untereinheiten rekonstituierbar ist. Zu diesem Zweck wurden die minimal erforderlichen Untereinheiten α, β und γ als erstes in einen Rekonstitutions-Puffer überführt. Dies erfolgte mittels der gegenüber einer Dialyse sehr viel schnelleren Gelfiltration (Abbildung 3-33). Da die gereinigte γ-Untereinheit hochkonzentriert vorlag (6 mg/ml in 6 M GdnHCl), konnte sie auch problemlos zum Rekonstitutionsansatz ohne vorherige Gelfiltration hinzugefügt werden. Der Volumenanteil war dabei so gering, dass das darin enthaltene GdnHCl sofort und ausreichend verdünnt wurde. In der Praxis zeigte sich kein Unterschied in Rekonstitutionen mit zuvor gelfiltriertem γ oder denaturiertem γ, das in den Rekonstitutionsansatz hinein verdünnt wurde.

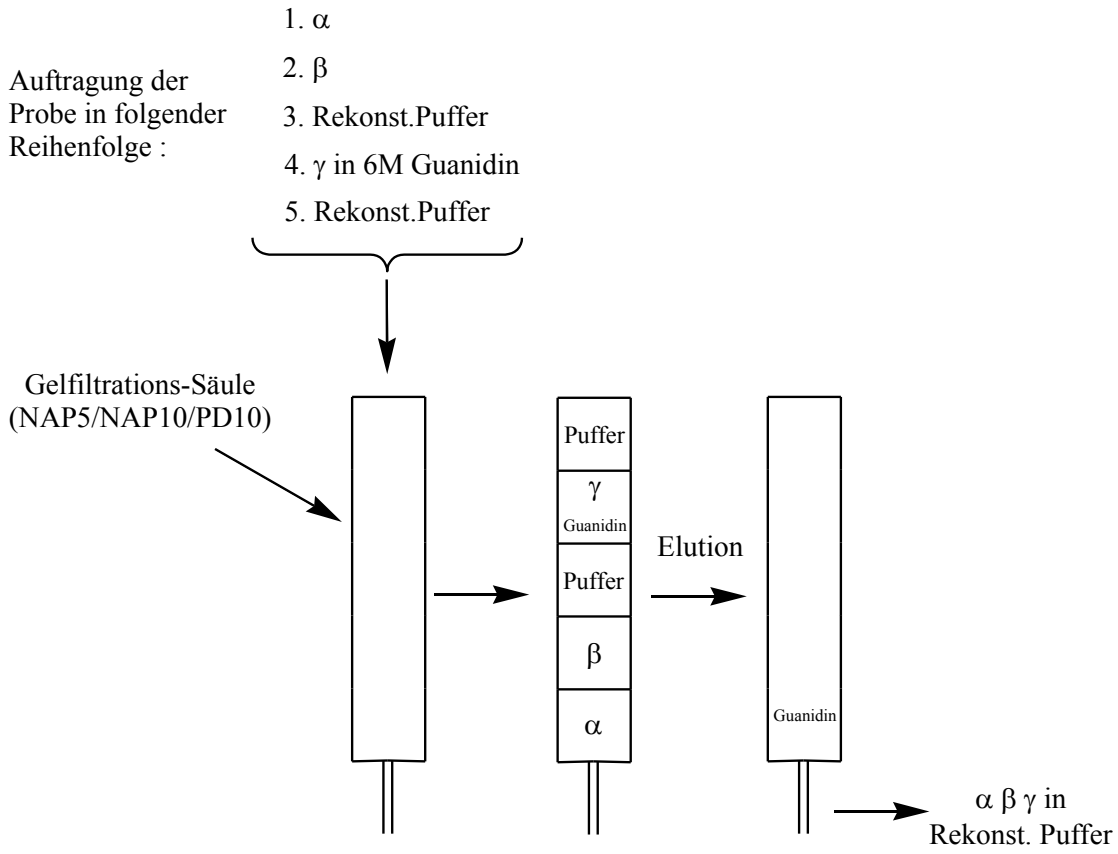


Abbildung 3-33: Durchführung der Rekonstitutions-Gelfiltration

Der Rekonstitutionsansatz (= das Eluat aus der Gelfiltration) wurde dann bei 25 °C inkubiert. Die Rekonstitution wurde in der Regel nach einer Stunde Inkubation beendet. Inwieweit sie schon vorher beendet war, wurde nicht untersucht. Es zeigte sich aber, dass sich eine deutliche Verlängerung der Inkubationszeit negativ auf den Rekonstitutionserfolg auswirkte. Dieser Verlust ist vermutlich mit einem zeitlich bedingten Ausfall des rekonstituierten EF_1 zusammen mit Fällungen einzelner Untereinheiten zu erklären.

Schon bei der Inkubation der Rekonstitutionsansätze fielen mindestens 50 % der Untereinheiten aus. Die Ursache ist unbekannt. Um das ausgefallene Protein abzutrennen, wurde die Probe nach der Inkubation 15 min bei 14000 rpm (20800 x g) zentrifugiert. Zur Überprüfung des Rekonstitutionserfolges wurde der Überstand durch eine Gelfiltration (XK 16/60, Superdex 200) analysiert. Da bei einer Gelfiltration die Bestandteile der Probe nach ihrer Größe getrennt werden, ließ sich so das rekonstituierte EF_1 aufgrund seines im Vergleich zu α und β geringeren Elutionsvolumens nachweisen und somit der Erfolg der Rekonstitution bestimmen.

Abbildung 3-34 zeigt die Elutionsprofile der Gelfiltrationen von Rekonstitutionsansätzen mit und ohne γ-Untereinheit.

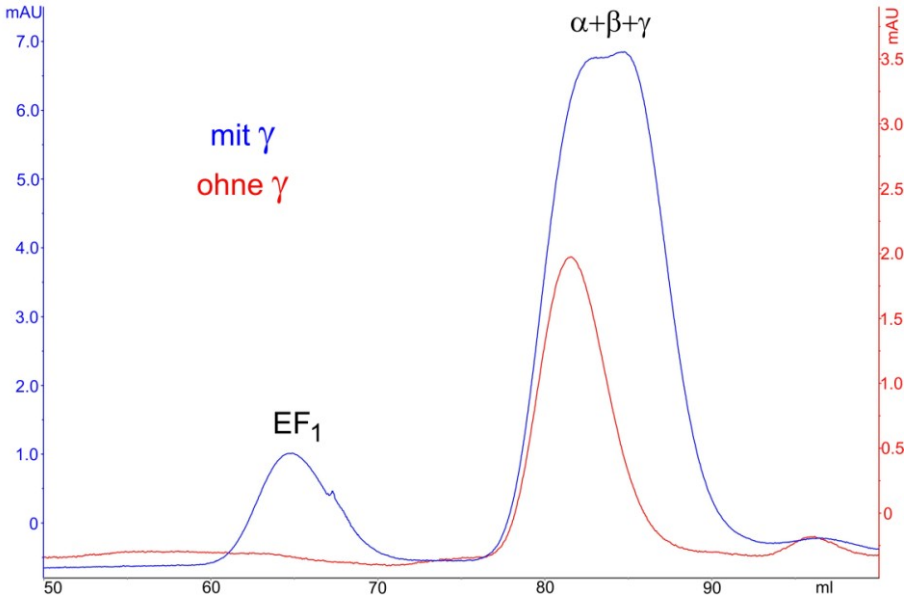


Abbildung 3-34: Gelfiltrationen von Rekonstitutionsansätzen mit und ohne γ

Blau: $A_{280\ nm}$ [mAU] Ansatz ohne γ; rot: $A_{280\ nm}$ [mAU] Ansatz mit γ. Säule: XK 16/60; Säulenmaterial: Superdex 200; Elutionsgeschwindigkeit 1 ml/min. Puffer: 50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl (pH 7,4).

Wie bereits weiter oben erwähnt, sollte die Rekonstitution ohne γ den möglichen Einfluss des in der β-Präparation enthaltenen γ überprüfen. Es ist ersichtlich, dass ohne zusätzlich zugefügtes γ kein (Rumpf)EF_1-Peak nachweisbar war.

Das so rekonstituierte EF_1 wurde aus der Gelfiltrationssäule direkt in eine nachgeschaltete Ni-NTA-Säule übertragen, nach vollständiger Probenaufgabe und Nachwaschen eluiert und dadurch soweit aufkonzentriert, dass Proteinbestimmungen möglich und somit die spezifische Aktivität messbar wurden. Die Fraktionen aus der Ni-NTA-Chromatographie wurden außerdem SDS-elektrophoretisch untersucht. Das entsprechende Gel ist in Abbildung 3-35 zu sehen. Die im Anschluss an die Ni-NTA-Chromatographie gemessene Aktivität des rekonstituierten EF_1 unterschied sich mit 98 U/mg nicht signifikant von nativem EF_1. Als Kontrolle der Aktivitätsmessung dienten eine Probe aus einem Rekonstitutionsansatz ohne γ, mit dem etwaiges bei den Präparationen verschlepptes EF_1 oder γ nachgewiesen werden kann. Als zweite Kontrolle diente eine Probe des rekonstituiertem EF_1, welches direkt vor der Aktivitätsmessung mit Hilfe von TCA denaturiert wurde. Falls diese Probe negativ war und die unbehandelte Probe Aktivität zeigte, war dies der Nachweis für die Hydrolyse des ATP durch das rekonstituierte EF_1. Beide Kontrollen waren bei jeder durchgeführten Messung negativ. Es wurde kein verschlepptes EF_1 oder γ nachgewiesen und die gemessene Aktivität des rekonstituierten EF_1 konnte jedes Mal durch Denaturierung mit TCA unterdrückt werden. Die so gemessenen ATPase-Aktivitäten sind in Tabelle 3.14 zusammengefasst.

Tabelle 3.14 : Gemessene ATPase-Aktivität der Rekonstitutionen mit nativem γ

Probe	*Aktivität [U/mg]*	*Anzahl der Messungen*	*Bemerkung*
EF_1	100 ± 10	23	A
Rekonstitutionen:			
α+β	2 ± 1	3	B,C
$\alpha+\beta+\gamma_{nat}$ +TCA	5 ±3	3	B,D
$\alpha+\beta+\gamma_{nat}$	98 ± 6	3	B

A) Gereinigt über DEAE und Ni-NTA. B) Gereinigt über Gelfiltration und Ni-NTA. C) Kontrolle zum Nachweis von verschlepptem EF_1 oder γ. D) Das rekonstituierte EF_1 wurde direkt vor der Messung mit TCA denaturiert.

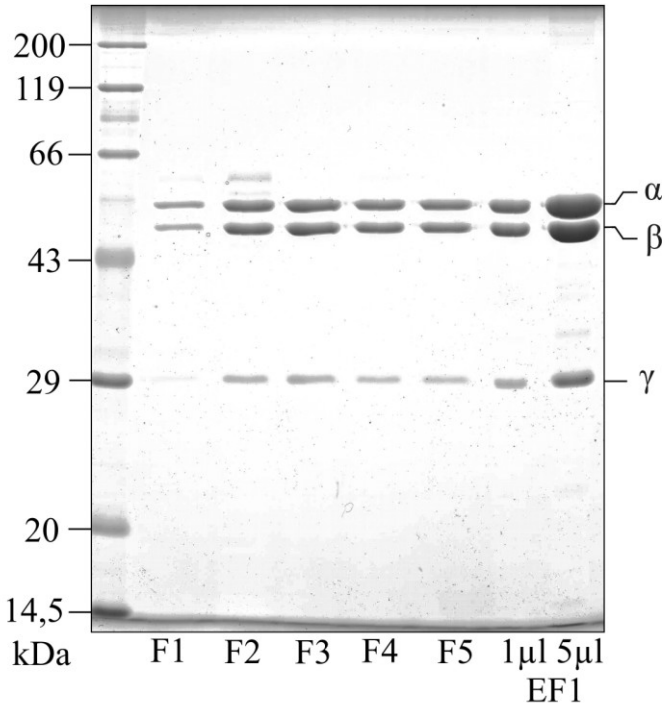


Abbildung 3-35: SDS-PAGE mit rekonstituiertem EF_1

SDS-PAGE (12,5 %) in Gegenwart von 0,1 % (w/v) SDS; Coomassie R-250 Anfärbung. Aufgetragen wurden Fraktionen 1–5 der Ni-NTA-Chromatographie des EF_1-Peaks der Gelfiltration (vgl. Abb. 3-33); M = Standard.

3.3.2 Rekonstitution mit totalsynthetischem γ

Da die bei der chromatographischen Reinigung des letzten Ligationsansatzes (Ligationsprodukt 23456 + Peptid 1) gesammelten Fraktionen nicht direkt dem gewünschten Produkt (Peptid 123456 = $\gamma_{synth.}$) zugeordnet werden konnten, wurden alle Fraktionen mittels MALDI-MS analysiert. Dazu wurden die Fraktionen anhand des Chromatogramms der HPLC-Reinigung in sieben Pools (Abbildung 3-36) zusammengefasst und dann analysiert. Das erwartete Massensignal von ca. 31,3 kDa zeigte sich lediglich in den Pools 2, 3 und 4 (Abbildung 3-37).

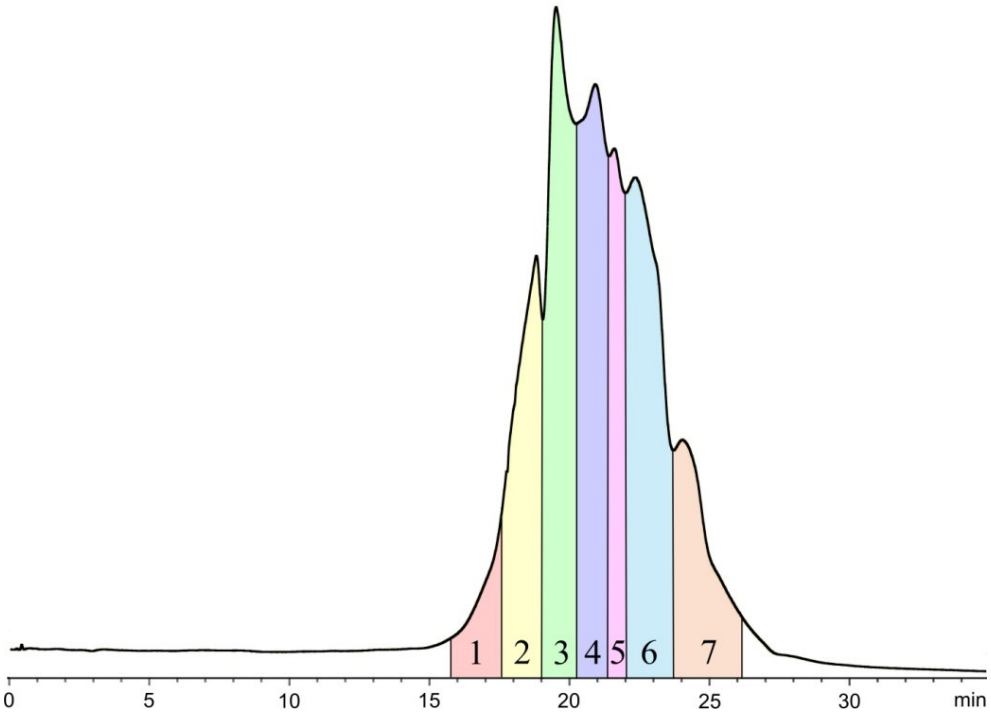


Abbildung 3-36: HPLC-Lauf der Reinigung des 5. Ligationsansatzes (Ligationsprodukt 23456 + Peptid 1)

UV-Chromatogramm (210 nm). Linearer Gradient von 30-70 % Puffer B in 80 min bei 40 °C. Puffer A : 0,1% TFA in 10% Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril. Die Zahlen 1-7 markieren die die sieben Pools.

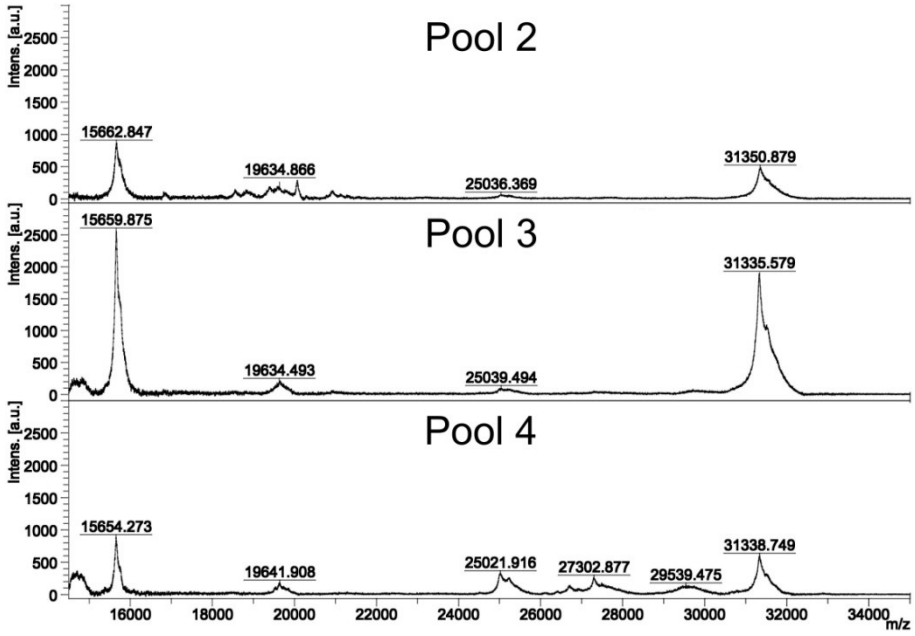


Abbildung 3-37: MALDI-MS von Fraktionen (Pools 2, 3 und 4) der Chrom. des letzten Ligationsansatzes

MALDI-MS der vereinigten Fraktionen (Pools 2, 3 und 4) der Chromatographie des letzten Ligationsansatzes. Das gesuchte Produkt hat ein m/z Verhältnis von ca. 31336 (z=1) und von ca. 15660 (z=2). Als Matrix wurde Sinapinsäure verwendet.

Die größte Produktkonzentration wies Pool 3 auf. Außer der gesuchten Produktmasse traten die Massen der vorherigen Ligationsprodukte 23456 (25 kDa) und 3456 (19 kDa) auf. Diese Verunreinigungen waren zu erwarten, da die Produkte im Verlauf der Ligationen immer ähnlichere Retentionszeiten zeigten und somit nicht vollständig ohne spürbare Ausbeuteverluste voneinander trennbar waren.

Pools 2, 3 und 4 wurden gefriergetrocknet und in je 25 µl 6 M GdnHCl aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde durch die UV-Absorption bei 280 nm mit Hilfe eines Nano-Drop-Spektrophotometers bestimmt. Als Kalibrierstandard diente hier die durch Überexpression erhaltene γ-Untereinheit, die ebenfalls in 6 M GdnHCl gelöst war und deren Konzentration mit 6 mg/ml bekannt war. Tabelle 3.15 zeigt das Ergebnis dieser Proteinbestimmung.

Tabelle 3.15: Ergebnisse der Proteinbestimmung der Pools 2, 3 und 4.

Vereinigte Fraktionen	*Menge*
Pool 2	30 µg
Pool 3	30 µg
Pool 4	40 µg

Diese drei Proben wurde dann zusammen mit den Untereinheiten α und β wie oben beschrieben rekonstituiert (vgl. Kapitel 3.3.1).

In der Gelfiltration war nur im Ansatz mit Pool 3 ein Peak mit dem bekannten Elutionsvolumen des (Rumpf)EF_1 feststellbar. Die drei Gelfiltrationsläufe sind in Abbildung 3-38 zusammengefasst.

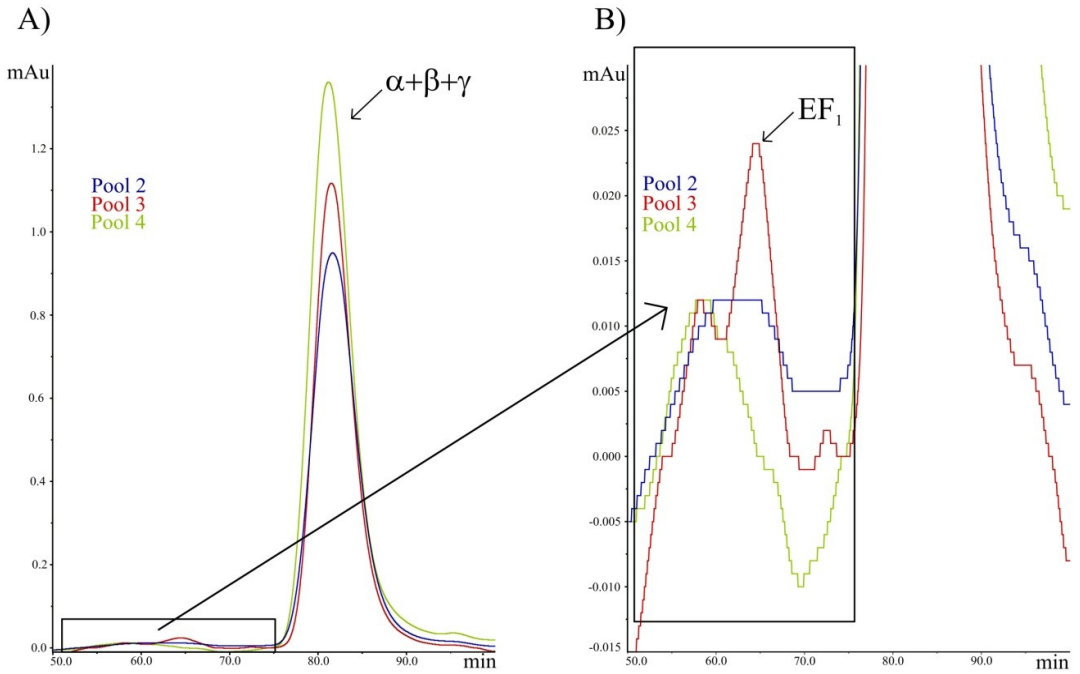


Abbildung 3-38: Ergebnisse der Gelfiltration von Rekonstitutionen mit den Pools 2, 3 und 4

Alle Chromatogramme: A_{280} [mAU], blau: Rekonstitution mit Pool 2, rot: Rekonstitution mit Pool 3, grün: Rekonstitution mit Pool 4; Matrix: GE Superdex 200; Säule: Pharmacia XK 16/60 (16 x 600 mm); Elutionsgeschwindigkeit 1 ml/min. Puffer: 50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl (pH 7,4).

A) Die großen Peaks enthalten die nicht rekonstituierten Untereinheiten α, β und γ.

B) Diese Abbildung zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Abbildung A. Bei einer Retentionszeit von ca. 64,5 min eluiert wie in den Vorversuchen gezeigt das aus Pool 3 und den separate zugefügten Untereinheiten α und β rekonstituierte (Rumpf)EF_1 (rote Linie).

Das aus Pool 3, α und β rekonstituierte Rumpf-EF_1 wurde aus der Gelfiltrationssäule direkt auf eine Ni-NTA-Säule gegeben. Das Eluat der nachfolgenden Ni-NTA-Chromatographie wurde durch Ultrafiltration (50 kDa Ausschlussgröße) konzentriert. Die Proteinbestimmung dieser Probe ergab eine Konzentration von 0,22 mg/ml. Bei einem Probenvolumen von 50 µl ergab dies eine Gesamtmenge von 11 µg rekonstituiertem Rumpf-EF_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma_{synth}$). Abschließend wurde die ATP-Hydrolyseaktivität dieser Probe untersucht, die mit 98 U/mg genau der Aktivität des mit überexprimiertem γ rekonstituierten Rumpf-EF_1 entsprach.

Die so gemessenen ATPase-Aktivitäten sind in Tabelle 3.16 zusammengefasst. Abbildung 3-39 zeigt ein SDS-Gel mit diesem rekonstituierten EF_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma_{synth}$).

Tabelle 3.16 : Gemessene ATPase-Aktivität der Rekonstitutionen mit synthetischem γ

Probe	*Aktivität [U/mg]*	*Anzahl der Messungen*	*Bemerkung*
EF_1	100 ± 10	23	A
Rekonstitutionen:			
α+β	3 ± 1	3	B,C
$\alpha+\beta+\gamma_{synth}$ +TCA	4	1	B,D
$\alpha+\beta+\gamma_{synth}$	98 ± 6	3	B

A) Gereinigt über DEAE und Ni-NTA. B) Gereinigt über Gelfiltration und Ni-NTA. C) Kontrolle zum Nachweis von verschlepptem EF_1 oder γ. D) Das rekonstituierte EF_1 wurde direkt vor der Messung mit TCA denaturiert.

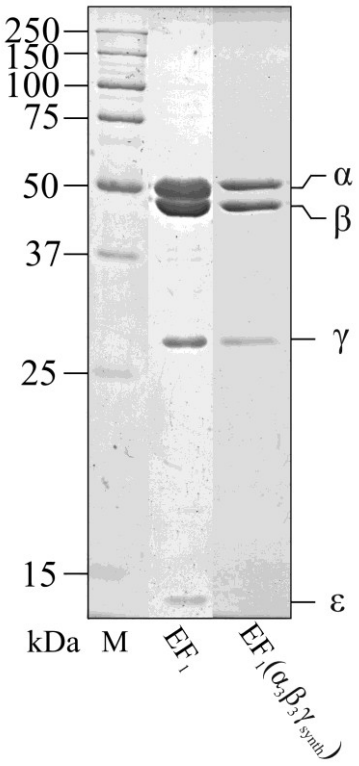


Abbildung 3-39: SDS-PAGE mit rekonstituiertem Rumpf-EF_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma_{synth}$)

SDS-PAGE (12,5 %) in Gegenwart von 0,1 % (w/v) SDS; Coomassie R-250 Anfärbung. Aufgetragen wurde eine Probe des mit der totalsynthetischen γ-Untereinheit rekonstituierten Rumpf-EF_1. M = Standard; EF_1 = EF_1-Standard.

3.3.3 Fällung der Untereinheiten bei der Rekonstitution

Bei allen Rekonstitutionen fiel jeweils ein großer Teil der Untereinheiten sehr schnell aus. Ein SDS-elektrophoretischer Vergleich identischer Rekonstitutionsansätze mit und ohne γ ergab, dass die β-Untereinheit deutlich stärker in Gegenwart von γ ausfiel (Abbildung 3-40).

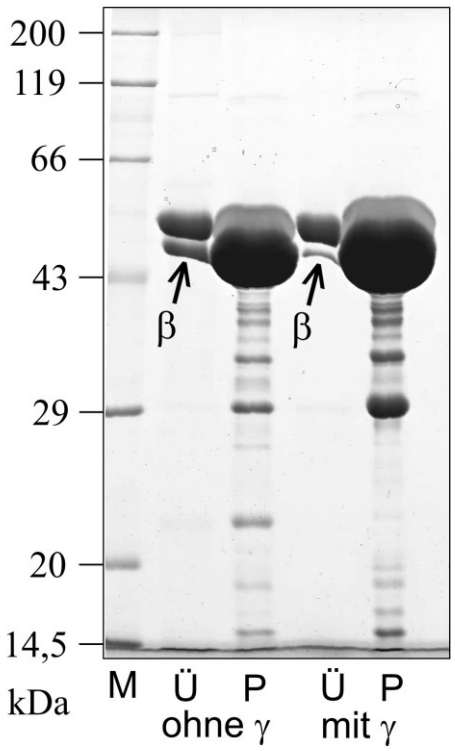


Abbildung 3-40: SDS-PAGE mit Rekonstitutionsansätzen mit und ohne γ

SDS-PAGE (12,5 %) in Gegenwart von 0,1 % (w/v) SDS; Coomassie R-250 Anfärbung. Es wurden Rekonstitutionsansätze mit γ und ohne γ bei 25 °C für 1h inkubiert und dann abzentrifugiert. Aufgetragen wurden Überstand (Ü) und Pellet (P) der jeweiligen Proben. Der β-Anteil im Überstand ist beim Ansatz mit γ deutlich geringer (mit Pfeilen markiert). M = Standard.

Dieses Verhalten überraschte und beeinträchtigte den Erfolg der Rekonstitution. Daraufhin wurden in einer Reihe von Versuchen die Wechselwirkungen der drei Untereinheiten genauer betrachtet. Die einzelnen Untereinheiten α, β und γ und ihre Kombinationen wurden unter den üblichen Rekonstitutionsbedingungen eine Stunde bei 25 °C inkubiert und anschließend 10 min bei 14000 rpm (20800 x g) zentrifugiert. Die Zusammensetzung der Ansätze ist in Tabelle 3.17 aufgeführt.

Tabelle 3.17: Massenanteile einzelner Untereinheiten bei Rekonstitutionsansätzen

Untereinheit	*Ansatz*				
	α	β	γ	α+γ	β+γ
α	135 µg	0	0	135 µg	0
β	0	135 µg	0	0	135 µg
γ	0	0	60 µg	60 µg	60 µg

Die Überstände wurden komplett mit TCA gefällt, die Pellets direkt im SDS-Probenpuffer resuspendiert und dann alle Proben mittels SDS-PAGE untersucht. Das entsprechende Gel ist in Abbildung 3-41 zu sehen.

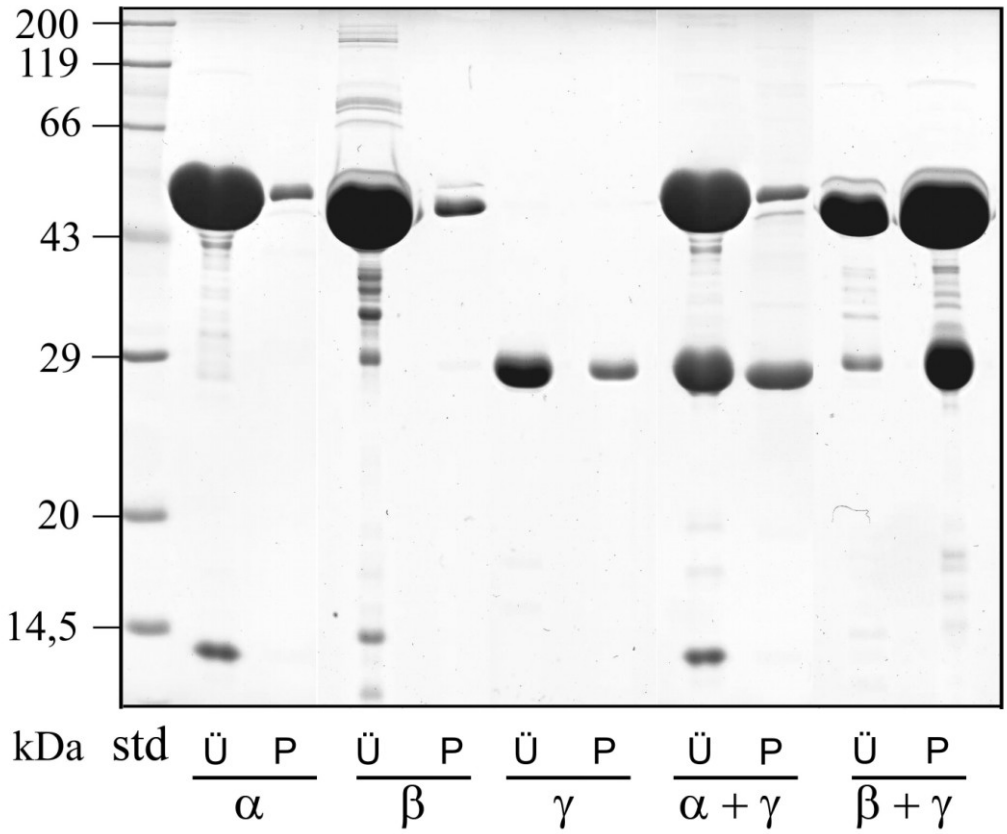


Abbildung 3-41: Fällung von α, β und γ unter Rekonstitutionsbedingungen

SDS-PAGE (12,5 %) in Gegenwart von 0,1 % (w/v) SDS; Coomassie R-250 Anfärbung. Ü = Überstand. P = Pellet. Details siehe Text.

Es ist ersichtlich, dass die drei einzelnen Untereinheiten vergleichsweise wenig Tendenz zeigten, unter Rekonstitutionsbedingungen auszufallen, da sie weitgehend im Überstand verblieben. In etwas abgeschwächter Form gilt dies auch für die Kombination α + γ, nicht aber für β + γ, die weitgehend ausfielen. Das erklärt zum einen die generell geringen Rekonstitutionsausbeuten. Zum anderen deutet es auf eine spezielle Wechselwirkung zwischen den β- und γ-Untereinheiten, die so zwischen α und γ nicht auftritt, ein im Hinblick auf die $(\alpha\beta)_3\gamma$-Struktur überraschender Befund, da γ als zentraler Rotor inmitten des $(\alpha\beta)_3$-Hexagons mit beiden anderen Untereinheiten wechselwirkt. Falls die beobachtete Fällung konzentrationsabhängig war, wurde in einem weiteren Rekonstitutionsversuch die Konzentration der β-Untereinheit langsam gesteigert. Dazu wurden die einzelnen Untereinheiten gegen Rekonstitutionspuffer gelfiltriert. Dann wurden α und γ vorgelegt und β langsam portionsweise hinzugefügt. Diese Vorgehensweise führte jedoch weder zur Reduktion der Fällungen noch zur Verbesserung des Rekonstitutionserfolges insgesamt.

Warum nur die β-, nicht jedoch die α-Untereinheit das Fällungsverhalten gemeinsam mit der γ-Untereinheit zeigte, ist nicht bekannt. Neben den Unterschieden in ihren nativen Sequenzen enthielt β einen His-*tag*. Es bleibt unklar, ob und inwieweit dieser His-*tag* für die stark ausgeprägte Assoziation zwischen β und γ und das gemeinsame Ausfallen verantwortlich war.

3.3.4 Diskussion

Ein erster sehr wichtiger Teilaspekt der vorliegenden Arbeit war die erfolgreiche Rekonstitution des Rumpf-EF_1 $(\alpha\beta)_3\gamma$ mit rekombinantem γ. Da die Rekonstitution aus den drei Untereinheiten grundlegend für das gesamte Projekt und somit auch für die geplante Synthese der γ-Untereinheit war, wurde sie zeitlich vor den Synthesen durchgeführt. Aufgrund ihrer Bedeutung und um sicher zu gehen, dass das angewendete Verfahren reproduzierbar war, wurde erst nach mehreren erfolgreich durchgeführten Rekonstitutionen mit der Synthese begonnen. Zudem bot sich damit auch die Möglichkeit, das Protokoll zu optimieren und die Abläufe einzuüben, was mit der synthetisch hergestellten Untereinheit wegen der zu erwartenden geringen verfügbaren Menge später nicht möglich gewesen wäre. Vor jeder Rekonstitution mit synthetischem γ wurde als Positivkontrolle eine Rekonstitution mit überexprimiertem γ durchgeführt. Damit war sichergestellt, dass die Untereinheiten α und β rekonstituierfähig waren, die verwendeten Puffer verwendbar und alle verwendeten Geräte und Chromatographie-säulen funktionsfähig. Auf diese Weise konnte ein fataler Misserfolg bei einer Rekonstitution aufgrund vermeidbarer Fehler ausgeschlossen werden.

Das eigentliche Ziel dieser Arbeit war die erfolgreiche Rekonstitution mit vollsynthetischem γ. Der Erfolg dieses Experiments wäre ein klarer Beweis für die prinzipielle Machbarkeit des gesamten Projektes, es würde den Weg bahnen für eine optimierte Synthese des D-Enantiomers von γ. Dabei war sowohl der massen-spektrometrische Nachweis des Syntheseerfolgs erforderlich, als auch die biologische Kompatibilität mittels Rekonstitution und ATPase-Aktivität.

Das Protokoll der Rekonstitution war schließlich so robust, dass bei Verwendung frisch präparierter Untereinheiten α und β stets die zuvor mit präpariertem EF_1 erhaltenen ATPase-Aktivitäten im Bereich von ~98 U/mg gemessen wurden. Das größte Problem bei der Rekonstitution blieb der enorme Verlust an Protein durch irreversible Ausfällung. Es ist denkbar, dass die Assemblierung des EF_1 in der Zelle durch ein bisher nicht charakterisiertes Chaperon unterstützt wird, ähnlich dem vor kurzem für die Ribulosebisphosphat-Carboxylase gezeigten dedizierten Assemblierungschaperon [42]. Alternativ könnte die zelluläre Assemblierung der ATP-Synthase, also des Holoenzyms mitsamt der Protonentranslokator-Untereinheiten, koordiniert ablaufen. Hinweise darauf wurden in der Vergangenheit publiziert [43-48]. Der geordnete Zusammenbau des Holoenzyms unter Einbeziehung von F_O-Untereinheiten könnte ein Protonenleck verhindern und würde erklären, warum die Rekonstitutionsausbeuten in Abwesenheit von EF_O so gering waren.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Rekonstitutionen von EF_1 sind auch insofern mit dem oben geschilderten Szenario vereinbar, als (Rumpf)EF_1 nur vollständig rekonstituiert wurde, ohne das Auftreten von Teilkomplexen. So ergab die Rekonstitution ohne γ kein $(\alpha\beta)_3$-Hexamer. Es bleibt offen, inwieweit γ als Keimzelle der Rekonstitution wirkt oder das zuerst gebildete, aber noch instabile $(\alpha\beta)_3$-Hexamer stabilisiert. Die gleichzeitige Zusammenlagerung aller sieben beteiligten Untereinheiten ist in jedem Fall aus statistischen Gründen mehr als unwahrscheinlich.

Inwieweit der Rekonstitutionspuffer und die sonstige Durchführung der Rekonstitution weiter optimiert werden können, bleibt offen, wenngleich dramatische Änderungen angesichts der gewählten Bedingungen nicht zu erwarten sind. Die Dauer der Rekonstitution käme noch am ehesten als Optimierungsparameter in Frage. Die Rekonstitution wurde in der Regel eine Stunde lang durchgeführt. Falls das rekonstituierte EF_1 mit der Zeit wieder zerfällt oder zusammen mit den ausfallenden Untereinheiten präzipitiert wird, würde sich eine zu lange Inkubationszeit negativ auf die Ausbeute auswirken.

Die Rekonstitution von Rumpf-EF_1 mit vollsynthetischem γ war trotz der vielen Änderungen der Aminosäuresequenz im Vergleich zu nativem γ erfolgreich (siehe Tabelle 3.11). Dass die neu eingeführten Cysteine keinen negativen Einfluss auf die Aktivität hatten, war im Vorfeld durch die beschriebene Kontrollklonierung nachgewiesen worden. Inwieweit diese Cysteinreste Probleme bei der Faltung des Proteins durch die Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken verursachten, wurde nicht untersucht. Die Faltung des vollsynthetischen γ erfolgte stets unter reduzierenden Bedingungen (d.h. in Gegenwart von TCEP), wodurch die Bildung von Disulfidbrücken verhindert wurde. Bei den anderen Modifikationen konnten negative Auswirkungen dagegen nicht ausgeschlossen werden. Dies betraf im Einzelnen:

- E5D (bedingt durch einen Fehler in der Datenbank)
- D107A (Nebenproduktbildung bei Ligationen mit Asp-Thioestern)
- W203 mit CHO-Schutzgruppe (versehentliche Verwendung der geschützten Aminosäure)
- V286A (Schlechte Kopplung von Valin-Linker)

Die Modifikation E5D in der Nähe des N-Terminus' ist potentiell kritisch, da dieser Bereich im $(\alpha\beta)_3$-Hexagon rotiert. Der Austausch des negativ geladenen Glutamatrestes gegen den ebenfalls negativ geladenen, wenngleich kleineren, Aspartatrest ist jedoch offenbar folgenlos geblieben. D107A liegt unmittelbar vor dem für den mikrovideographischen Rotationsnachweis erforderlichen Rest L108C am Rand der γ-Untereinheit und in einer Region deutlich unterhalb des $(\alpha\beta)_3$-Hexagons.

Die Tatsache, dass das biotinylierte K108C als Ankerpunkt für ein sehr viel größeres Aktinfilament dienen kann, ohne dass dies die Relativrotation von γ unter ATP-Hydrolyse behindern würde, deutete darauf hin, dass die D107A-Modifikation tolerabel sein würde. CHO-W203 stellte einen ärgerlichen, weil vermeidbaren Synthesefehler dar, der allerdings zum Zeitpunkt seiner Entdeckung infolge der dann anfallenden enormen Synthesen und Ligationen nicht mehr ohne weiteres reparabel war. Glücklicherweise befindet sich W203 am äußersten Rand von γ, so dürfte der Volumenzuwachs von W203 nicht ins Gewicht gefallen sein – was bei einer Rekonstitution mit Untereinheit ε womöglich anders ausgesehen hätte. V286A, der C-terminale Rest von γ, kann zusammen mit 10 weiteren Resten unter Teilerhalt der ATPase-Aktivität deletiert werden [34]. Zwar ist eine Deletion nicht mit einem Austausch identisch, aber das im Vergleich zum Valin kompaktere Alanin sollte keine Auswirkungen auf die biologische Kompatibilität von γ haben, was durch die erfolgreiche Rekonstitution ja auch bestätigt wurde. Eine weitere Abweichung von der nativen γ-Struktur sind die ursprünglich für den Rotationstest eingeführten Mutationen C87A und C112A. Diese beiden Modifikationen befanden sich in allen verwendeten γ-Untereinheiten („natives“ EF_1, γ_{nat}, γ_{synth}) und hatten keinen feststellbaren Einfluss auf die Aktivität des Enzyms. Die synthetisch bedingten Modifikationen sind in Abbildung 3-42 und Abbildung 3-43 gezeigt.

Die chemische Totalsynthese von biologisch aktivem γ ist eine unverzichtbare Vorbedingung für die angestrebte Totalsynthese des D-Enantiomers von γ. Gleichzeitig wird die Größenbegrenzung für chemisch synthetisierbare Proteine in den 30 kDa-Bereich verschoben. Diese Arbeit zeigt in befriedigender Weise die erfolgreiche Etablierung der chemischen Proteinsynthese, insbesondere der Boc-SPPS und der nativen chemischen Ligation. Während der Versuche zeigte sich aber auch die Unverzichtbarkeit von im jeweiligen Einzelfall erforderlichen experimentellen Anpassungen, die jeweils Hinweise auf alternative Gesamtsynthesestrategien und Detailänderungen gaben, die den Syntheseerfolg verbessern und absichern dürften.

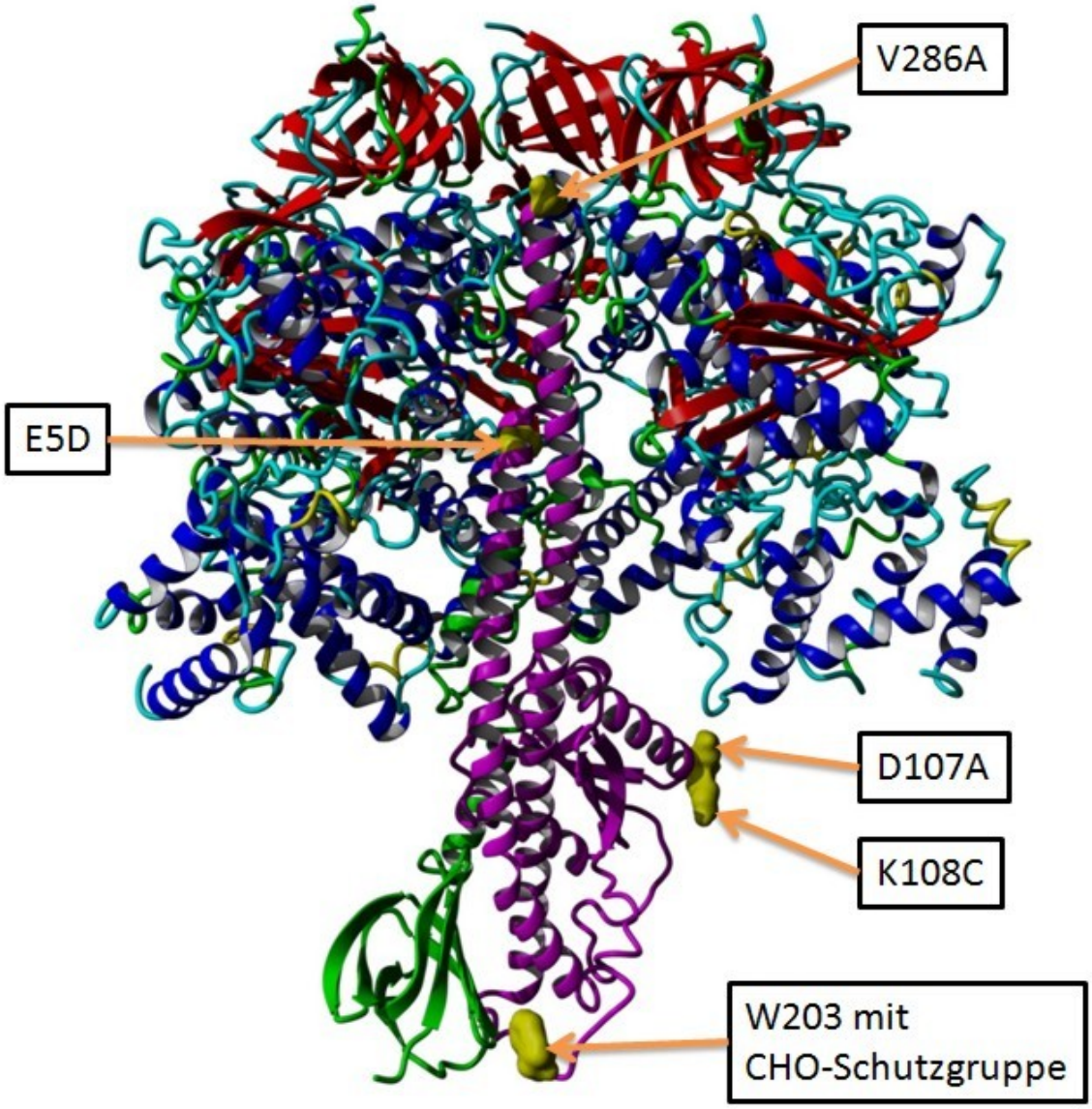


Abbildung 3-42 : Röntgenkristallographisches Modell von EF_1

Das gezeigte Modell basiert auf dem Datensatz pdb: 3oaa aus der Duncan-Gruppe[13]. Die Abbildung wurde mit dem Programm YASARA[3] erzeugt. Sie zeigt EF_1 mit drei α- und zwei β-Untereinheiten im oberen Bereich (eine β-Untereinheit wurde zur besseren Sichtbarkeit der γ-Untereinheit entfernt), mit γ in violett im Zentrum und ε unten links in grün (vorwiegend β-Stränge). Die Oberflächen der geänderten Aminosäurereste sind gelb eingefärbt. In den Untereinheiten α und β sind die α-Helices blau und die β-Stränge rot eingefärbt. In der Abbildung steht A284 stellvertretend für die in der Struktur nicht aufgelösten Reste A285-V286.

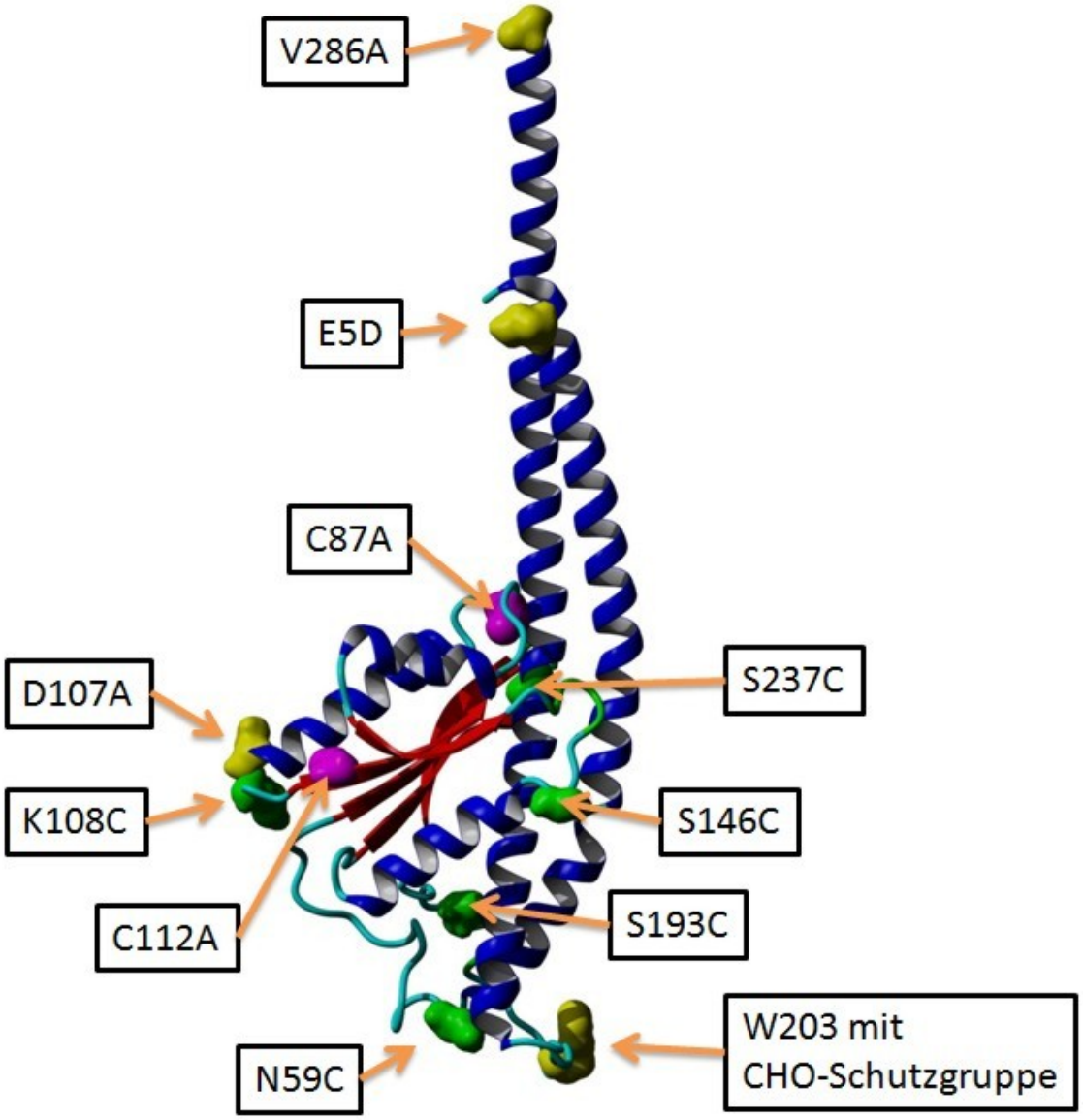


Abbildung 3-43 : Röntgenkristallographisches Modell der γ-Untereinheit

Das gezeigte Modell basiert auf dem Datensatz pdb: 3oaa[13]. Die Abbildung wurde mittels YASARA[3] erzeugt, die Oberflächen der bei der Totalsynthese geänderten Aminosäurereste sind hervorgehoben. Die Oberflächen der für die Ligation unerlässlichen Cysteine (C59, C108, C146, C193, C237) sind gelb eingefärbt. Die ursprünglich für den Rotationstest aus der natürlichen γ-Untereinheit entfernten Cysteine (C87A, C112A) sind magenta eingefärbt. Die aus mechanistischen Gründen während der Synthese (V286A) und der Ligation (D107A), sowie die aus Synthesefehlern (E5D, W203) resultierenden Änderungen sind gelb eingefärbt. In der Graphik steht das A284 stellvertretend für die beiden nicht aufgelösten Reste A285 und V286.

4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die Synthese eines 286-Reste-langen Proteins, der γ-Untereinheit der ATP-Synthase, seine Rückfaltung und Rekonstitution zum aktiven Proteinkomplex gezeigt. Infolge der zum Teil gravierenden Ausbeuteverluste, vor allem bei den letzten Ligationen, wurde dieses Ziel nur durch den Einsatz einer enormen Menge an Ausgangsmaterialien erreicht.

Die Ergebnisse im Einzelnen:

- Die Dissoziation von EF_1 in seine Untereinheiten und die daran anschließende Reinigung der Untereinheiten α und β in ausreichender Menge und Qualität wurden etabliert. Es erwies sich als günstig, jeweils frisch präpariertes EF_1 direkt gegen den Dissoziationspuffer zu gelfiltrieren, da eine Lagerung des EF_1 als Ammoniumsulfat-Präzipitat auf Dauer nicht möglich war, sondern seinerseits zur Dissoziation in nicht weiter verwendbares Material führte. Leider wurde keine Methode zur dauerhaften Lagerung der gereinigten Untereinheiten gefunden, sodass diese vor jeder Rekonstitution frisch präpariert werden mussten.

- γ wurde erfolgreich überexprimiert und aus den dabei auftretenden Einschlusskörpern in reiner Form isoliert. Die Untereinheit faltete sich nach Entfernen des denaturierenden Lagerungspuffers wieder in eine biokompatible Form zurück. Die Lagerung in diesem Puffer erwies sich als problemlos, selbst nach zwei Jahren trat kein Verlust der biologischen Aktivität auf.

- Rumpf-EF_1 wurde erfolgreich aus den Untereinheiten α, β und überexprimiertem γ rekonstituiert. Für die Rekonstitution wurden die Untereinheiten mittels Gelfiltration zusammengeführt und anschließend inkubiert. Dabei fielen leider bis etwa 95 % der eingesetzten Proteine aus, was zum Teil auf Wechselwirkungen der gefalteten Untereinheiten beruhen dürfte, die so *in vivo* nicht auftreten, da dort die Zusammenlagerung anders organisiert ist. Im Hinblick auf das eigentliche Ziel der Arbeit, die Totalsynthese von γ, wurden keine weitergehenden Versuche unternommen, die Rekonstitutionsausbeuten zu verbessern. Zudem hatte das nach Gelfiltration und anschließender Ni-NTA-Chromatographie erhaltene rekonstituierte $(\alpha\beta)_3\gamma$ mit 98 ± 6 U/mg die gleiche spezifische Aktivität wie natives EF_1 (100 ± 10 U/mg).

- In einem separaten Kontrollexperiment wurde nachgewiesen, dass die aus methodischen Gründen zur Peptidligation eingeführten Cysteinreste in der γ-Sequenz weder die biologische Aktivität noch den mikrovideographischen Rotationsnachweis (der ein passend positioniertes, zugängliches Cystein erfordert) beeinflusste.

- Bei der Synthese der Peptide zeigten sich keine schwierig zu synthetisierenden Aminosäuresequenzen. Die einzelnen Peptide waren präparativ problemlos zugänglich. Lediglich bei Peptid 3 musste zur besseren Chromatographierbarkeit an den C-terminalen Thioester ein Tetra-Arginin-*tag* synthetisiert werden.

- Die Ligation der einzelnen Peptide zum vollständigen Protein war, bei allerdings minimaler Ausbeute, erfolgreich. Vor allem die drei letzten Ligationen waren für den enormen Ausbeuteverlust verantwortlich. Ansätze mit sogenannter *one-pot*-Ligation, die prinzipiell höhere Ausbeuten verspricht, führten hier zu keinem befriedigenden Ergebnis. Die Ausbeute und Reinheit der Ligationsprodukte war deutlich schlechter als bei der üblichen Ligationsmethode, weshalb die *one-pot*-Strategie nicht weiter verfolgt wurde.

- Mit der synthetisch hergestellten γ-Untereinheit wurde $(\alpha\beta)_3\gamma$ erfolgreich rekonstituiert. Für die Rekonstitution standen zwar nur insgesamt 30 µg des synthetischen γ zur Verfügung, aber diese Menge reichte gerade noch aus. Die Aktivität des rekonstituierten $(\alpha\beta)_3\gamma$ war mit 98 ± 6 U/mg identisch mit der Aktivität des mit überexprimiertem γ rekonstituierten EF_1.

Abschließend noch ein paar bemerkenswerte Zahlen, die den beträchtlichen Aufwand der vorgelegten Arbeit unterstreichen:

- Durch die Mehrfachsynthesen der einzelnen Peptide und durch die zu Beginn noch durchgeführten Doppelkopplungen ergibt sich die stolze Zahl von 1242 manuellen Einzelkopplungen, wobei insgesamt fast 200 l DMF und annähernd 18 l TFA verbraucht wurden.

- Insgesamt wurden 54 präparative Chromatographien mit den Rohpeptiden durchgeführt. Für die Analysen der dabei erhaltenen Fraktionen sowie für die Analysen der später durchgeführten Ligationen wurden insgesamt 2322 analytische HPLC-Chromatographien sowie 972 analytische HPLC-MS-Chromatographien durchgeführt.

- Bei den HPLC-Chromatographien wurden nur im Labor in Osnabrück (ohne HPLC-MS und ohne die Chromatographien in Chicago) zusammen 45 l Acetonitril verbraucht.

Unstrittig ist dem die ribosomale Biosynthese überlegen. Sie hat dafür jedoch eine deutlich längere Entwicklungszeit benötigt. ;-)

5 Methoden

Die Auflistung der verwendeten Materialien befindet sich im Anhang (Kapitel 7.1, Seite 142)

5.1 Stämme, Plasmide und Primer

5.1.1 Stämme

5.1.1.1 E. coli DK8

Genotyp: 1100 Δ(uncB-uncC) ilv::Tn10

Dieser *E. coli*-Stamm wurde von Klionsky et al. hergestellt und kann aufgrund der Deletion Δ(uncB-uncC), die das ATP-Synthase-Operon von Untereinheit a (uncB) bis Untereinheit ε (uncC) umfasst, keine ATP-Synthase exprimieren (Klionsky et al. 1984). Für das Wachstum auf nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen ist der Stamm daher auf eine plasmid-codierte ATP-Synthase angewiesen. Die Unfähigkeit von *atp*-Deletionsmutanten zum Wachstum auf Kohlenstoffquellen wie Succinat oder Malat beruht dabei nicht in erster Linie auf dem Fehlen der ATP-Synthase, da diese Zellen auch weiterhin mit Hilfe des Zitronensäurezyklus bzw. dem Abbau von Pyruvat zu Acetat und ATP zur ATP-Gewinnung fähig sein sollten. Vielmehr beeinflusst bei dem Wachstum von *atp*-Mutanten auf Succinat oder Malat offenbar ein verändertes ATP/ADP-Verhältnis die DNA-Struktur (van Workum et al. 1996) und damit auch die Expression eines C4-Dicarbonsäure-Transporters, wodurch die Zellen diese Substrate nicht mehr aufnehmen können (Boogerd et al. 1998).

Weiterhin besitzt der Stamm durch das Transposon Tn10 eine Tetracyclinresistenz (Foster et al. 1981). Der *E. coli*-Stamm DK8 wurde für die Expression von plasmidcodierten EF_1-Mutanten verwendet.

Stammbeschreibung übernommen aus Müller (2004)[34].

5.1.1.2 E. coli JM109

Genotyp: *end*A1, *rec*A1, *gyr*A96, *thi*, *hsd*R17 (r_k-, m_k+), *rel*A1, *sup*E44, λ-, Δ(*lac-pro*AB), [F´, *tra*D36, *pro*AB, *lac*I^qZΔM15]

5.1.1.3 E. coli BL21 (DE3)

Genotyp: F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)

5.1.1.4 E. coli ES1301 mutS

Genotyp: *lac*Z53, *mut*S201: Tn5, *thy*A36, *rha*-5, *met*B1, *deo*C, IN(*rrn*D-*rrn*E)

5.1.2 Plasmide

5.1.2.1 pKH7

Der Vektor pKH7 stammt ursprünglich von dem 3941 bp großen Plasmid pACYC177 ab, dessen NheI/BamHI-Fragment (und damit auch die Kanamycin-Resistenz von pACYC177) entfernt und durch ein Fragment, das die Schnittstellen HindIII und XbaI enthält, ersetzt wurde. Innerhalb dieser Schnittstellen enthält pKH7 acht Gene des *E. coli atp*-Operons von *atp*B (Untereinheit a) bis *atp*C (Untereinheit ε). Alle Wildtyp-Cysteine (bC21, δC65, δC141, αC47, αC90, αC193, αC243, γC87, γC112 und βC137) wurden durch Alanine ersetzt (Kuo et al. 1998) und ein His6-tag (Aminosäuresequenz: MRGSHHHHHHGMATG…) am N-Terminus der Untereinheit β eingeführt. Weiterhin enthält der Vektor die Mutation AAA → TGC an der Position des Codons für den 108. Aminosäurerest der Untereinheit γ, wodurch dort ein Cystein eingeführt wird (γK108C) (Noji et al. 1999). Ein Sequenzvergleich des *atp*-Operons von pKH7 mit der Wildtyp-Sequenz von *E. coli* K12 ist im Anhang aufgeführt.

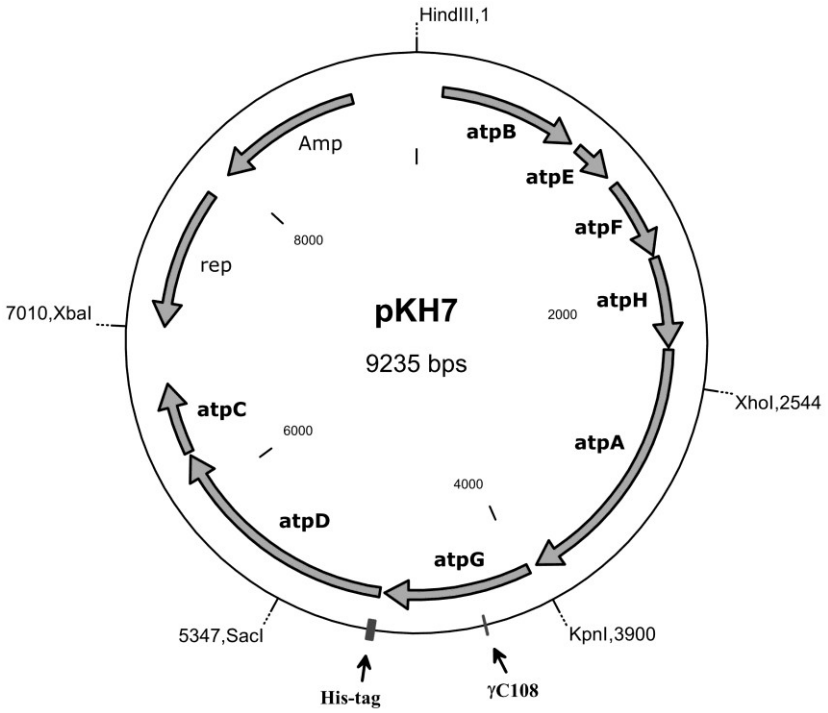


Abbildung 5-1: Plasmidkarte des pKH7-Vektors

Der Vektor und dessen Derivate wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Präparation von EF_1-Komplexen für Rotationsexperimente verwendet, da die entsprechenden Enzyme über das (einzige verbliebene) Cystein γC108 mit Biotin-Maleimid modifiziert werden können und somit später über eine Kontaktstelle für die Anbindung eines Actin-Filaments an die Untereinheit γ verfügen.

Plasmidbeschreibung übernommen aus Müller (2004)[34].

5.1.2.2 pALTER-1-Vektor

Dieser Vektor wird in dem Altered Sites® II in vitro Mutagenesis System des kommerziellen Anbieters Promega verwendet. Er besitzt eine Polylinkerregion, die von T7- und SP6-Promotoren flankiert ist. Zudem enthält er Resistenzgene gengen die Antibiotika Ampicillin und Tetracyclin. Die Resistenz gegen Ampicillin ist im Ursprungsvektor durch eine Punktmutation ausgeschaltet und wird erst bei der Durchführung der Mutagenese wieder eingeschaltet.

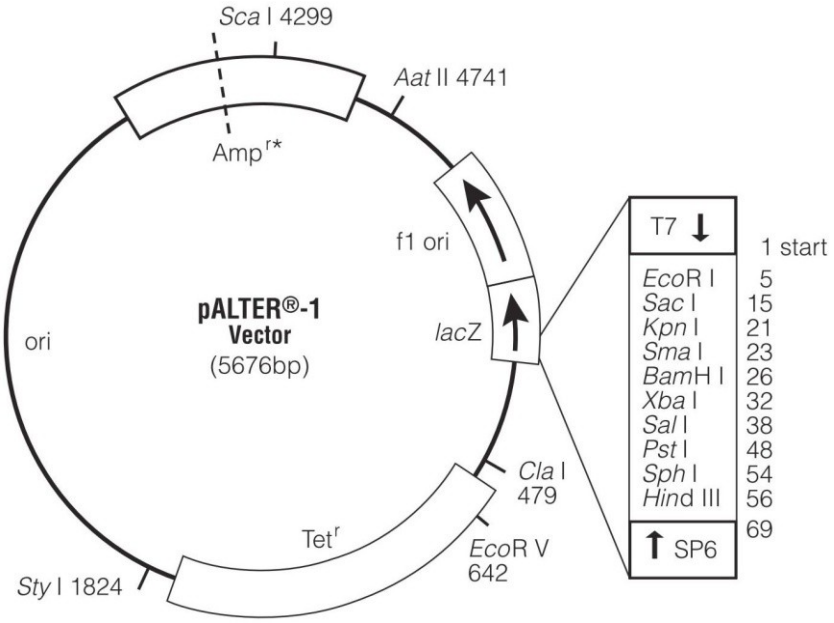


Abbildung 5-2: Plasmidkarte des pALTER®-1-Vektors

(Promega, Technical Manual, Altered Sites® II in vitro Mutagenesis System, Part# TM001, Revised 4/09)

5.1.3 Primer

Tabelle 5.1: Liste der verwendeten Primer

Primer	*Sequenz*
N60C	5‘-GTG CTT ATA TTC CAG ACA ACC GTG TGC AAG-3‘
S146C	5‘-CGG ACC GAT CAG TTC GCA CAG GGA AGG GTT-3‘
S193C	5‘-CAG ATC ATC ATC ATC GCA TGC CGG TAA CGG-3‘
S237C	5‘-GGC GGC CTG CTC GCA GGC CAG GTT TTC AAC-3‘
Ampicillin Knockout	5‘-GTT GCC ATT GCG GCA TCG TGG TGT CAC-3‘
Ampicillin Reparatur	5‘-GTT GCC ATT GCT GCA GGC ATC GTG GTG-3‘
Tetracyclin Knockout	5‘-GCC GGG CCT CTT GCG GGC GTC CAT TCC-3‘
Tetracyclin Reparatur	5‘-GCC GGG CCT CTT GCG GGA TAT CGT CCA-3‘
T7 Sequenzierprimer	5‘-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3‘
SP6 Sequenzierprimer	5‘-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA-3‘

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Klonierung des 5-Cys-γ

Die Kontrollklonierung von γ wurde mit dem „Altered Site® II in vitro Mutagenesis System‘‘ von Promega durchgeführt.

Bei diesem System wird ein Plasmid (pALTER-1) mit den Resistenzgenen gegen Ampicillin und Tetracyclin verwendet. Im Original-Plasmid war die Resistenz gegen Ampicillin jedoch durch eine Punktmutation ausgeschaltet. Bei der eigentlichen Klonierung wurden neben den eigenen Mutations-Primern zwei weitere Primer eingesetzt. Der eine dieser Primer reparierte die Ampicillinresistenz und der andere Primer schaltete die Tetracyclin-Resistenz aus. Durch dieses Ein- und Ausschalten der Resistenzen ließen sich dann Klone selektieren, bei denen die Klonierung zumindest an den Resistenz-Genen funktioniert hatte. Ob alle gewünschten Mutationen eingeführt wurden, ließ sich aber nur durch den Nachweis möglicher neuer Restriktions-schnittstellen im Plasmid oder durch eine Sequenzierung nachweisen.

Im nächsten Abschnitt werden die einzelnen Arbeitsschritte dieses Klonierungs-Systems beschrieben. Abbildung 5-3 zeigt einen Überblick über die einzelnen Schritte dieser Mutations-PCR.

Als erstes musste das zu bearbeitende pKH7-Plasmid-Fragment mit der γ-Sequenz (Insert) in das pALTER-1-Plasmid integriert werden. Dafür besitzt das Plasmid eine „multiple cloning site’’. Durch eine alkalische Denaturierung wurde das Plasmid (mit dem integrierten Insert) in seine Einzelstränge zerlegt. Dann wurde eine PCR mit den Mutations-Primern sowie mit den Primern zum An- und Ausschalten der Resistenzen durchgeführt. Zum Binden der Primer wurde der Reaktionsansatz 5 min auf 75°C erhitzt, dann langsam (1°C/min) auf 45°C abgekühlt und schließlich schnell mit Hilfe eines Eisbades auf Raumtemperatur abgekühlt. Der mutierte Strang wurde danach mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase und -Ligase vervollständigt.

Da alle Primer nur an einen der beiden Einzelstränge binden, war das Produkt dieser PCR ein Plasmid mit zwei unterschiedlichen, nicht vollständig komplementären Strängen. Der eine Strang entsprach dem Ursprungs-Plasmid und der Zweite enthielt die eingeführten Mutationen. Damit diese „Fehler‘‘ in der Plasmidsequenz nicht automatisch durch Reparaturmechanismen des damit transformierten Bakteriums korrigiert wurden, musste ein *E. coli* Stamm verwendet werden, bei dem dieses Reparatursystem nicht mehr funktionierte. Aus diesem Grund wurde hier der *E. coli* Stamm ES1301 *mut*S verwendet, bei dem das Basenpaarungsreparatur-Protein MutS ausgeschaltet ist.

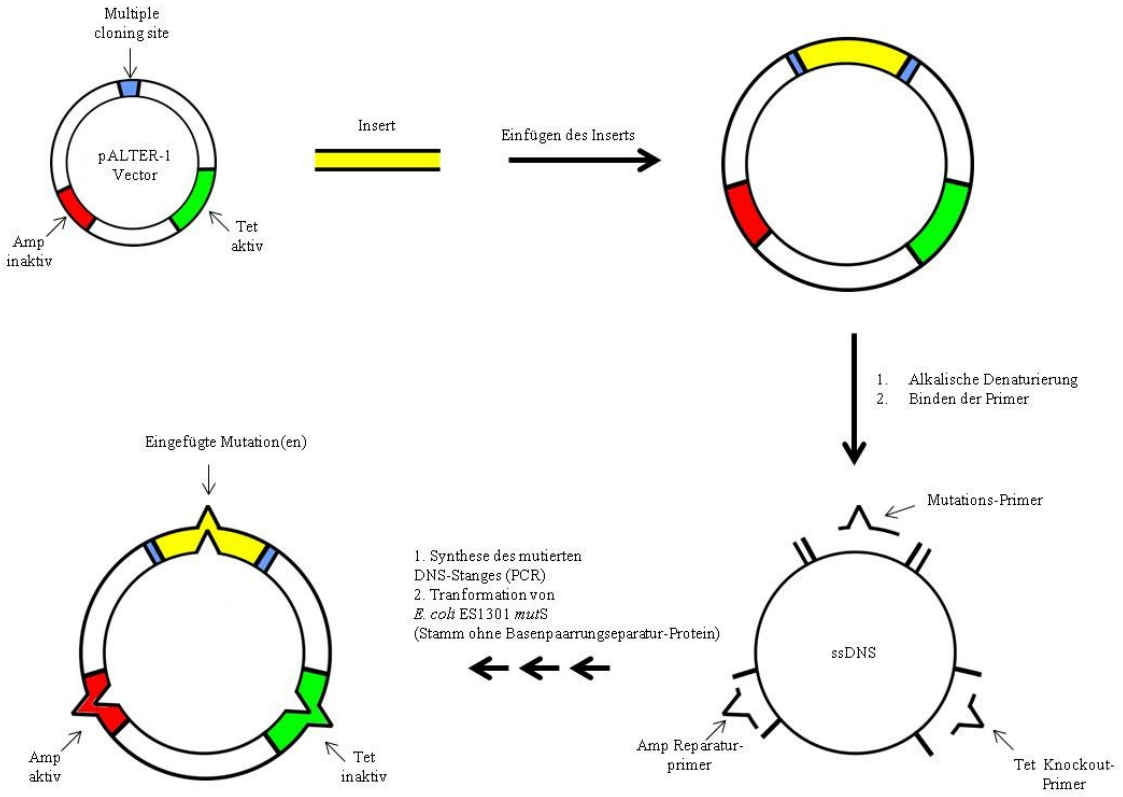


Abbildung 5-3: Überblick über die einzelnen Schritte der Klonierung des 5-Cys-γ

Die Klonierung basiert auf dem ,,Altered Site® II in vitro Mutagenesis System'' der Firma Promega. Die Abbildung wurde anhand der Anleitung erstellt (Promega, Technical Manual, Altered Sites® II in vitro Mutagenesis System, Part# TM001, Revised 4/09).

Weil das Plasmid ja wie erwähnt aus einem mutierten und einem unveränderten Strang bestand, kam es bei der Replikation des Plasmides in der Zelle zur Bildung von zwei verschiedenen Plasmiden, mit und ohne den gewünschten Mutationen. Da das mutierte Plasmid nun aber eine Resistenz gegenüber Tetracyclin enthielt, konnte durch Kultivierung auf tetracyclinhaltigen Medien das gewünschte Plasmid selektiert werden.

Weil der verwendete *E. coli*-Stamm das Plasmid nur in geringen Konzentrationen produzierte und natürlich vorkommende falsche Basenpaarungen nicht reparieren kann, musste mit dem Plasmid ein anderer *E. coli*- Stamm transformiert werden. Das Promega-System verwendet dafür JM109.

Nun konnte mittels Sequenzierung überprüft werden, ob alle Mutationen erfolgreich eingeführt wurden. Falls dies nicht der Fall war, wurde das Plasmid erneut und mit derselben Vorgehensweise bearbeitet und somit die fehlenden Mutationen nachträglich eingeführt. Danach wurde die Tetracyclin-Resistenz wieder ausgeschaltet und die Ampicillin-Resistenz wieder hergestellt.

Zunächst erfolgte jedoch eine Überprüfung, ob das Gen für die Resistenz gegen Ampicillin wirklich vollständig ausgeschaltet war, da bei der ersten Replikation des mutierten Plasmides auch ein Plasmid entstand, das dem Ausgangsplasmid entsprach und somit die Ampicillin-Resistenz enthielt, da sonst dieses Plasmid nicht von dem Plasmid eines möglichen zweiten Mutations-Zyklus unterschieden werden konnte.

5.2.2 Isolierung von Plasmiden

Für die Isolierung der Plasmide wurde das QIAprep spin miniprep kit von Qiagen verwendet. Die Isolierung wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Für die Isolierung wurden 1-5 ml einer *E. coli*-Übernachtkultur verwendet.

5.2.3 Analytische und präparative Restriktionen

Für die Restriktionsschnitte wurden ausschließlich FastDigest-Restriktionsenzyme der Firma Thermo Scientific verwendet. Alle Enzyme dieser Serie zeigen in dem speziellen FastDigest-Puffer eine Aktivität von 100%. Zudem ist dieser Puffer auch kompatibel zur thermosensitiven alkalischen Phosphatase FastAP dieses Herstellers. Somit war eine Reinigung der Reaktionsansätze zwischen den Restriktionen und vor der Dephosphorylierung nicht nötig. Die analytischen Restriktionschnitte dienten der Überprüfung der verwendeten Plasmide und des Ligationserfolges. So ließ sich feststellen, ob ein Insert wirklich in das Plasmid integriert worden war. Der Erfolg der Restriktion wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dabei wurde die Größe der Plasmid-Fragmente mit Hilfe eines DNA-Standards bestimmt wobei Übereinstimmungen mit den erwarteten Größen den Ligationserfolg belegten.

Alle Restriktionen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Inkubation erfolgte generell im FastDigest Puffer bei 37°C für eine Stunde. Als Beispiel ist in der Tabelle 5.2 das Pipettierschema eines analytischen Restriktionsansatzes aufgeführt.

Tabelle 5.2: Pipettierschema für eine analytische Restriktion

Plasmid	*bis 1 µg*
FastDigest-Puffer (10X)	2 µl
Restriktionsenzyme	1 µl (je Enzym)
H_2O	Auf 20 µl Endvolumen auffüllen

Die präparativen Restriktionen dienten zur Herstellung der benötigten linearisierten Plasmide und Inserts. Nach der Öffnung wurden Plasmide zur Verhinderung der Religation an den 5`-Enden dephosphoryliert. Dafür wurde die thermosensitive alkalische Phosphatase FastAP der Firma Thermo Scientific verwendet. Da dieses Enzym kompatibel zum FastDigest-Puffer war, konnte die Dephosphorylierung zusammen mit der Restriktion durchgeführt werden.

In Tabelle 5.3 ist das Pipettierschema einer präparativen Restriktion mit gleichzeitiger Dephosphorylierung angegeben.

Tabelle 5.3: Pipettierschema für eine präparative Restriktion mit gleichzeitiger Dephosphorylierung

Plasmid	*1 µg*
FastDigest-Puffer (10X)	2 µl
Restriktionsenzyme	1 µl (je Enzym)
FastAP	1 µl
H_2O	Auf 20 µl Endvolumen auffüllen

Nach erfolgreicher Elektrophorese wurden die linearisierten Plasmide und Inserts aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert.

5.2.4 Ligation von Plasmidfragmenten

Für die Ligation von Plasmidfragmenten zu vollständigen Plasmiden wurde eine T4-Ligase verwendet. Das in den Vektor zu integrierende Insert wurde in 4-fachem molarem Überschuss in der Reaktion eingesetzt. Die Ligation würde über Nacht bei 16 °C durchgeführt. Als Vektorkontrolle diente ein Ansatz ohne Insert. Damit sollte überprüft werden, ob der Vektor selbst religiert und ob er mit ungeschnittenem Plasmid verunreinigt war. Falls der Vektor selbst religierte, musste man dies durch eine Dephosphorylierung des Vektors vor der Ligation verhindern.

5.2.5 Transformation von *E. coli* -Zellen

Für die Transformation wurden 5 µl einer 1:100 verdünnten Plasmidlösung mit 50 µl kompetenter Zellen vermischt. Dieser Ansatz wurde dann 20 min auf Eis gelagert. Für den benötigten Hitzeschock wurden die Zellen für 60 Sekunden auf 42 °C erwärmt und danach sofort wieder mit Eis gekühlt. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium ohne Antibiotika wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, bevor die Zellen auf vorgewärmte und antibiotikahaltige LB-Agar-Platten ausgestrichen wurden.

Als Kontrollen für die Transformation dienten hier LB-Agar-Platten, auf denen die kompetenten Zellen ohne Plasmid ausgestrichen wurden. Auf diesen Platten sollten keine Kolonien wachsen. Falls doch, waren die kompetenten Zellen verunreinigt, oder es wurde nicht steril genug gearbeitet.

5.2.6 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung Kompetenter Zellen wurde die TSS-Methode angewendet [49]. Bei dieser Methode wird die Zellmembran mit Hilfe eines speziellen TSS-Mediums (mit DMSO und PEG 8000) permeabel gemacht.

Als erstes wurden Übernachtkulturen der kompetent zu machenden Zellen 1:100 mit frischem LB-Medium verdünnt und bei 37°C inkubiert. Es wurde so lange kultiviert, bis die OD_{600} des Mediums einen Wert von ca. 0,35 erreichte. Dann wurde 1 ml dieser Zellsuspension genommen und für 5 min auf Eis gelagert. Nach Zentrifugieren der Probe (14.000 upm, 4 °C) wurde das Zellpellet in 75 µl gekühltem LB-Medium resuspendiert. Zu dieser Suspension wurde dann 75µl TSS-Medium gegeben, der Ansatz vorsichtig vermischt und für 5 min. auf Eis gelagert. Nun konnten diese Zellen direkt transformiert werden, oder für eine spätere Transformation nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert werden.

5.2.7 Agarose Gelelektrophorese

Mit einer Agarose-Gelelektrophorese lassen sich Plasmid-Fragmente der Größe nach trennen. Dabei wird ausgenutzt, dass DNA aufgrund ihrer negativen Eigenladung im elektrischen Feld wandert. Das bei dieser Elektrophorese verwendete Agarosegel dient hierbei als „Molekularsieb‘‘ und bewirkt, dass große Fragmente deutlich stärker in ihrer Bewegung im elektrischen Feld gehindert werden als kleine. Deshalb wandern die kleinen Fragmente am schnellsten und die großen Fragmente am langsamsten.

Es wurden generell nur Gele mit einer Agarose-Konzentration von 1% verwendet. Die benötigte Menge an Agarose wurde in der Hälfte des benötigten TBE-Puffers aufgekocht und vollständig gelöst. Nun wurde die andere Hälfte des TBE-Puffer hinzugefügt und somit die Temperatur der Lösung deutlich verringert. Dies wirkte sich positiv auf die Haltbarkeit der Gelgießstände aus und verringerte natürlich die Zeit, die das Gel benötigte, um fest zu werden. Zu dieser Lösung wurden dann 4 µl (pro 50 ml) einer 1 prozentigen (w/v) Ethidiumbromid-Lösung zugefügt und vorsichtig vermischt. Als letzter Schritt wurde dann das Gel gegossen.

Die Proben wurden für die Gelelektrophorese in einem Beladungspuffer gelöst und in die vorbereiteten Probentaschen des Gels pipettiert. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Nach erfolgreicher Elektrophorese wurde das mit UV-Licht bestrahlte Gel fotografiert, die Proben aus dem Gel ausgeschnitten und die Plasmide oder Plasmid-Fragmente mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert.

5.3 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

5.3.1 Zellanzucht

Vor der eigentlichen Hauptkultur wurden zwei aufeinanderfolgende Vorkulturen durchgeführt. Für die erste Vorkultur wurden 50 ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit 100 µl Stammkultur angeimpft und über Tag kultiviert.

Für die zweite Vorkultur wurde 1 Liter Mangelmedium mit der ersten Vorkultur angeimpft. Es wurde dabei so viel von der ersten Kulturbrühe zum Animpfen verwendet, bis das Mangelmedium lediglich eine leichte Trübung aufwies.

Nach Kultivierung über Nacht wurde mit der zweiten Vorkultur die Hauptkultur angeimpft. Dabei wurde auf eine OD_{600} der Hauptkultur von 0,1 angeimpft.

Die Hauptkultur wurde mit 12 Liter Mangelmedium bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator durchgeführt. Mittels Wachstumskurve wurde der Zeitpunkt der Zellernte bestimmt. Dieser Zeitpunkt war erreicht, wenn die exponentielle Wachstumsphase beendet war und die Kultur in die stationäre Phase überging. Die OD_{600} betrug zu diesem Zeitpunkt ca. 0,8 - 0,9.

Aus einer 12 Liter Kultur wurden ca. 20-25g Biofeuchtmasse gewonnen. Die Zellen wurden dann sofort in dem EF_1-Präp.-Puffer 1 resuspendiert, der für die nachfolgende Präparation des EF_1 verwendet wurde. Zu dieser Suspension wurde außerdem die für die Präparation benötigte DNAse II und Proteaseinhibitoren gegeben. Die Zell-Suspension wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.3.2 Wachstumstests auf Succinat

Die Funktionalität des aeroben Stoffwechsels und somit indirekt die Funktionsfähigkeit der ATPase ließ sich bei die Kultivierung der verwendeten *E. coli* Stämme mit Medien, die Succinat als einzige und nicht vergärbare C-Quelle besaßen, überprüfen. Dazu wurde der zu untersuchende Stamm auf drei verschiedenen Agarmedien ausgestrichen. Das erste Medium war ein ganz normales LB-Medium. Das Zweite besaß nur Glukose und das dritte Medium nur Succinat als C-Quelle. Die Agarplatten wurden bei 37°C inkubiert und das Wachstum über mehrere Tage kontrolliert. Das LB-Medium und das Medium mit der Glucose dienten hier als Kontrollen dafür, ob die Stämme überhaupt lebensfähig waren. In diesen Medien waren vergärbare C-Quellen vorhanden und die Zellen konnten auch ohne ATPase existieren und wachsen. Auf dem Succinat-Medium konnten nur Stämme mit funktionsfähiger ATP-Synthase überleben und wachsen. Als Positivkontrolle wurde *E. coli* DK8/pKH7 und als Negativkontrolle *E. coli* DK8 (ohne funktionsfähige ATPase) ohne Plasmid verwendet.

5.4 Biochemische Arbeitsmethoden

5.4.1 Präparation von EF_1

Die Präparation von EF_1 erfolgte nach einem Verfahren, das ursprünglich von Wise (Wise, 1990)[35] beschrieben wurde. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist im Anhang aufgelistet. Zu Beginn der Präparation wurden die in 100 ml Puffer 1 mit DNAse II und Proteaseinhibitoren eingefrorenen Zellen aufgetaut und 20 min gerührt. Nach Homogenisierung der Zellsuspension wurden die Zellen dann mit Hilfe einer *French-Press* aufgeschlossen (1280 PSI, 2 Durchgänge). Durch Zentrifugation bei 27.000 x g (20 min, 4°C) wurden die nicht aufgeschlossenen Zellen zusammen mit Zelltrümmern abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei 250.000 x g (1h, 4°C) zentrifugiert, das Pellet in Puffer 2 resuspendiert und anschließend homogenisiert. Es folgten drei weitere Zentrifugationen (250.000 x g, 1h, 4°C) mit zwischenzeitlicher Resuspendierung und Homogenisierung der Pellets. Dabei wurde der Puffer 2 erst durch Puffer 3 und schließlich durch Puffer 4 ersetzt. Der Überstand der letzten Zentrifugation (Probe in Puffer 4) wird als EDTA-Rohextrakt bezeichnet. Es enthält das von der Membran abgelöste EF_1. Die Vorgehensweise ist als Flussdiagram in Abbildung 5-4 zusammengefasst.

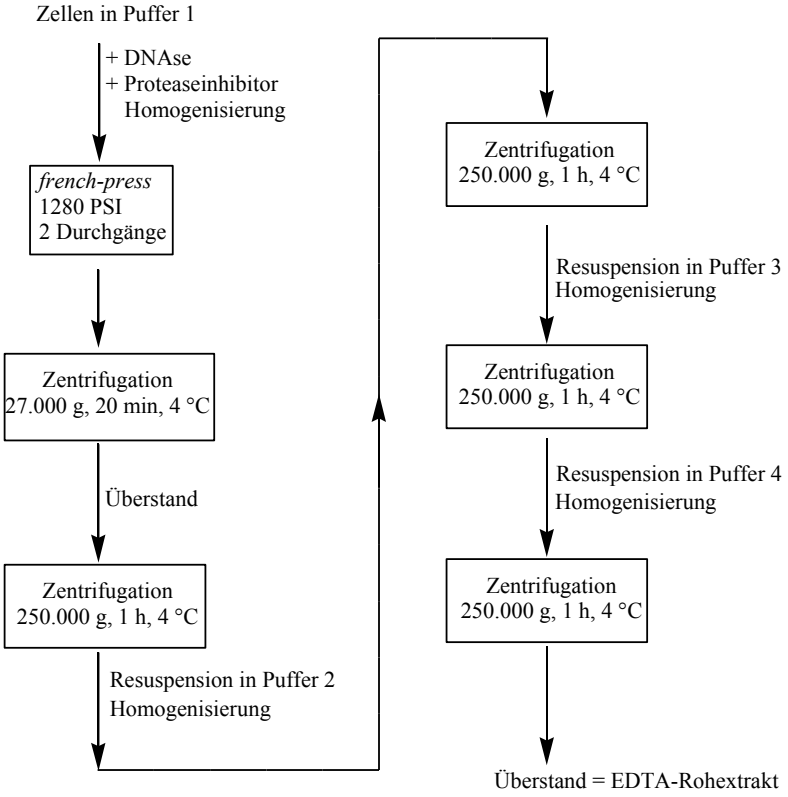


Abbildung 5-4: Flussdiagram der EF_1-Präparation

5.4.2 γ- Überexpression und Reinigung

Die γ-Untereinheit wurde in mit pGH12 (γ aus KH4 in pET16b-Vektor) transformierten *E. coli* Zellen (BL21(DE3)pLysS) überexprimiert. Die Induktion erfolgte mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Die überexprimierte γ-Untereinheit bildete Einschlußkörper. Diese Einschlußkörper ließen sich dann durch Zellaufschluß und Zentrifugation in einem weißlichen Pellet abtrennen. Die Einschlußkörper wurden mehrmalig im Einschlusskörperpuffer 1 und 2 resuspendiert und zentrifugiert. Dadurch wurde der größte Teil der Verunreinigungen (Zellmembranen und andere Zellkomponenten) entfernt. Das nun rein weiße Pellet wurde mit ca. 10 ml Guanidin-Puffer (6M Guanidin-HCl, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8) versetzt und über Nacht bei 4 °C gerührt. In Abbildung 5-5 ist ein Gel mit Proben der einzelnen Reinigungsschritte abgebildet. Nach dem Rühren wurde die Probe dann am nächsten Tag zentrifugiert und der Überstand gegen γ-Kationenaustauschpuffer A (mit 8M Harnstoff) gelfiltriert und anschließend an einer 5ml Hitrap SP HP-Säule chromatographiert (Abbildung 3-29). Die γ-Untereinheit eluierte bei 16,5-20% Puffer B in einem Gradienten von 0-30% Puffer B in 150 ml. Die vereinigten Fraktionen wurden ultrafiltriert, gegen Guanidin-Puffer gelfiltriert und bei -20°C gelagert.

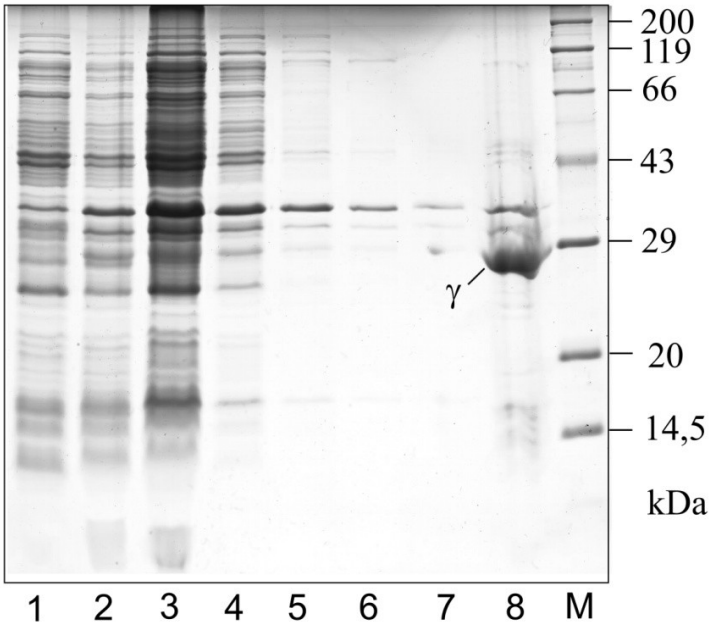


Abbildung 5-5: SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese mit Proben aus der γ-Reinigung

SDS-PAGE (12,5%) in Gegenwart von 0,1% (w/v) SDS; Coomassie R-250 Anfärbung. Aufgetragen wurden Proben aus einzelnen Schritten der Aufreinigung wie folgt: **1** Überstand Zellaufschluß; **2** Pellet Zellaufschluß; **3-7** Überstände der verschiedenen Waschschritte (**3** = Einschlußkörper-Puffer1(ESK-P1); **4-6** = Einschlußkörper-Puffer2 (ESK-P2); **7** = H_2O); **8** Pellet in 6M Guanidin-Puffer resuspendiert.

5.4.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde nach der Methode von Sedmak und Grossberg durchgeführt [50]. Dazu wurde ein Aliquot der zu vermessenden proteinhaltigen Probe mit H_2O auf ein Volumen von 500 µl verdünnt und mit 500 µl des Sedmak und Grossberg (S&G)-Reagenzes versetzt. Von dieser Probe wurde dann die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen den Leerwert gemessen. Der Test wurde mit Lysozym geeicht. Die Konzentration des Lysozyms betrug hierbei 5-30 µg/ml. Tabelle 5.4 zeigt das Pipettierschema der Proteinbestimmung nach Sedmak und Grossberg.

Tabelle 5.4: Pipettierschema der Proteinbestimmung nach Sedmak und Grossberg

	Leerwert	*Probe*
Proteinlösung	0 µl	x µl
H_2O	500 µl	500 – x µl
S+G-Reagenz	500 µl	500 µl

5.4.4 Bestimmung der ATPase-Aktivität

Das Verfahren zur Messung der ATP-Hydrolyseaktivität nach LeBel [51] weist das bei der Hydrolyse von ATP freigesetzte Phosphat spektrophotometrisch nach.

Durch die Reduktion des entstehenden Phosphomolybdat-Komplexes durch p-Methyl-Aminophenolsulfat und Kupferacetat entsteht ein blauer Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 745 nm gegen den Leerwert gemessen wurde. Zur Eichung wurde K_2HPO_4 in den Konzentrationen von 0,022 bis 0,175 µmol/Ansatz verwendet.

Für den Test wurden die einzelnen Komponenten nach dem Pipettierschema Tabelle 5.5 in 2 ml Eppendorf-Gefäße pipettiert. Die zu vermessende Probe wurde zuvor auf 0,01 mg/ml verdünnt. Die Testlösung wurde direkt vor dem Versuch nach dem Pipettierschema in Tabelle 5.6 angesetzt.

Die Proben wurden dann 5 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben zum Abstoppen der Reaktion sofort auf Eis gekühlt und mit 500 µl einer

gekühlten 0,5 M TCA (4 °C) versetzt. Zu den nun gekühlten Proben wurden dann 500 µl einer frisch angesetzten LeBel-Reagenzlösung gegeben. Diese setzte sich aus der Mischung der drei LeBel-Stammlösungen A, B und C wie 6 : 1 : 1 zusammen.

Tabelle 5.5: Pipettierschema zur Bestimmung der ATP-Hydrolyseaktivität nach LeBel

	µl	*[µg]*	*H_2O [µl]*	*Testlösung [µl]*
Leerwert	0	0	400	100
	5	0,022 µmol	395	100
Kalibrierung mit	10	0,044 µmol	390	100
1mg/ml K_2HPO_4	20	0,088 µmol	380	100
	30	0,131 µmol	370	100
	40	0,175 µmol	360	100
Probe 1	10	0,1	390	100
Probe 2	20	0,2	380	100
Probe 3	30	0,3	370	100

Tabelle 5.6: Pipettierschema für die Herstellung der Testlösung für den LeBel-Test

Stammlösung	*µl/Test*
1 M Tris/HCl pH 8	25
1 M $MgCl_2$	1,5
0,1 M ATP pH 7	50
H_2O	23,5

Zur restlosen Ausbildung des entstehenden Farbstoffes wurden die Proben aus dem Eisbad entfernt und auf Raumtemperatur erwärmt. Die Proben wurden dann nach 5 min Inkubation im Photometer bei einer Wellenlänge von 745 nm vermessen. Die Dauer dieser Inkubation bei RT war in den Laborprotokollen mit 5 min angegeben. Da diese Zeit aber gelegentlich zu kurz war, wurden die Proben zusätzlich nach 10, 15 und 20 min gemessen, wobei jeweils Leerwert und Eichung nachgemessen wurden.

Die Hydrolyseaktivität wird mit folgender Formel und den gemessenen Werten berechnet:

$$a_S[U/mg] = \frac{A^P_{745\,nm} \cdot 200}{A^S_{745\,nm} \cdot m}$$

mit :

a_s = Aktivität in U/mg

A^P_{745nm} = Absorption der Probe

A^S_{745nm} = Absorption des Standards

m = eingesetzte Menge an Protein [µg]

Der Faktor 200 ergibt sich aus der Umrechnung von µg in mg (Multiplikation mit 1000) und durch die Division durch die Inkubationszeit bei 37 °C (5 min)

5.4.5 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie wird zur Abschätzung der relativen Sekundärstrukturanteile von Proteinen eingesetzt. Die Methode basiert auf der (minimal) unterschiedlichen Absorption von links- und rechts zirkular polarisiertem Licht durch chirale Protein-(Sekundär)Strukturen. Aus den Messwerten lässt sich mit Hilfe verschiedener Algorithmen und Referenzdatensätze von bekannten Proteinen der Gehalt z.B. an α-Helices und β-Strängen bestimmen.

Für die CD-Spektroskopie wurde die in einem Guanidin-Puffer (6 M Guanidin-HCl, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 8) gelöste γ-Untereinheit zur Entfernung des Guanidins gegen Phosphatpuffer (20 mM KH_2PO_4, 10 mM KCl, pH = 7) gelfiltriert. Durch die Entfernung des Guanidins sollte sich das entfaltete γ im günstigsten Fall zur nativen Struktur zurückfalten. Allerdings resultiert dieses Verfahren oft genug in teilgefalteten Proteinen, die aggregieren und irreversibel ausfallen. Zur Entfernung ausgefallenen Proteins wurde die Probe vor der Messung eine Stunde zentrifugiert (100.000 x g, 4 °C). Nach Proteinbestimmung wurde die Probe dann im CD-Spektrometer vermessen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration ist überaus wichtig, da diese Konzentration direkt in die Berechnung der Sekundärstrukturen des Proteins eingeht. Auch eine nur geringfügige Abweichung führt bei der Auswertung zu einem merklich falschen Ergebnis. In Abbildung 5-6 wird die Abhängigkeit des errechneten Gehalts an α-Helix von der eingesetzten Proteinkonzentration gezeigt. Bei der Berechnung wurden die Originaldaten des γ-CD-Spektrums verwendet und lediglich die Proteinkonzentration verändert.

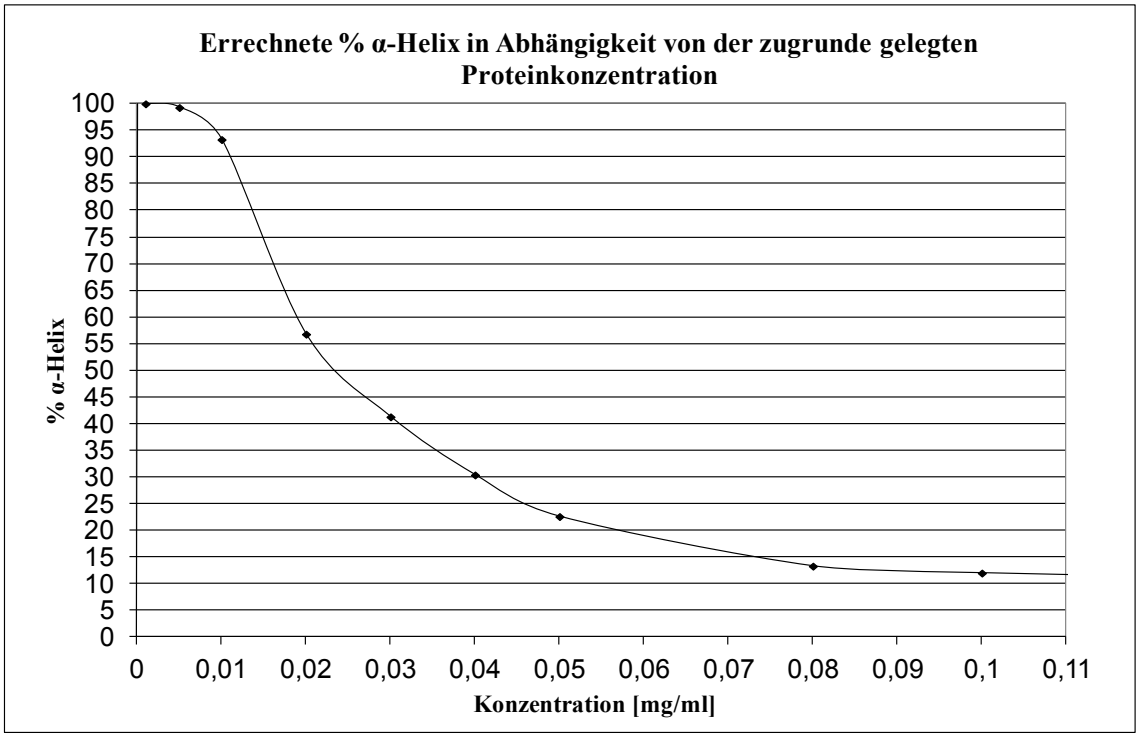


Abbildung 5-6: Abhängigkeit des errechneten α-Helix-Anteils von der Proteinkonzentration

Die einzige Möglichkeit zur exakten Bestimmung der Konzentration lag im genauen Auswiegen des entsalzten Proteins und anschließendem Lösen in Messpuffer. Voraussetzung dafür sind das Vorliegen des Proteins in reiner Form und das anschließende problemlose Auflösen. In der Praxis kann man mit derart idealen Bedingungen kaum rechnen, umso genauer müssen das Problem der Mengenbestimmung und deren Auswirkungen bei der Bewertung von Ergebnissen einer CD-spektroskopischen Untersuchung beachtet werden. Darüber hinaus liefern die verfügbaren Berechnungs-Algorithmen mitsamt der unterschiedlichen Referenzdatensätze u. U. sehr unterschiedliche Dateninterpretationen. Eine verlässliche Bestimmung der Sekundärstrukturanteile erfordert daher weitere, allerdings ungleich aufwendigere Verfahren wie die Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie.

5.4.6 SDS-Gelelektrophorese

Mit der SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) [52] lassen sich die Proteine einer Probe nach ihrer Molekularmasse auftrennen. Das SDS-Gel besteht üblicherweise aus dem Sammel- und dem Trenngel. Auf das Sammelgel wird die Probe aufgetragen und in diesem Gel wird die Probe zu Beginn der Elektrophorese konzentriert. Im Trenngel findet dann im Anschluss die eigentliche Trennung statt. Das Pipettierschema zur Herstellung dieser Gele ist in Tabelle 5.7 angegeben.

Tabelle 5.7: Pipettierschema für die Herstellung des Sammel- und des Trenngels für die SDS-PAGE

	5% Sammelgel (2,5ml)	*12,5 % Trenngel (10ml)*
H_2O	1,500 ml	3,180 ml
SDS Sammelgelpuffer	0,630 ml	-
SDS Trenngelpuffer	-	2,500 ml
Acrylamid	0,330 ml	4,170 ml
APS 10%	0,013 ml	0,050 ml
Temed	0,003 ml	0,005 ml

Die zu analysierenden Proteinproben wurden entweder direkt mit einem doppelt konzentrierten Probenpuffer versetzt oder zuerst mittels TCA-Fällung aufkonzentriert und dann im Probenpuffer gelöst. Das maximale Probenvolumen war 50 µl.

Die gelösten Proben wurden für ca. 5 min auf 90 °C erhitzt, abgekühlt und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Dann wurde die Elektrophorese mit 150 V und 50 A so lange durchgeführt, bis die Farbstofffront das Ende des Gels erreichte. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde das Gel mit einer Coomassie-Färbelösung gefärbt.

5.4.6.1 Coomassie Färbung

Für die Coomassie Färbung wurde das SDS-Gel kurz mit ddH_2O gespült und dann so lange in den Fixierer (10 % Eisessig, 40 % EtOH, 50 % H_20) gelegt, bis die Farbstofffront im SDS-Gel von blau auf grün umgeschlagen war.

Dann wurde der Fixierer entfernt und die Färbelösung hinzugefügt. Diese bestand aus 80 ml H_2O und jeweils 10 ml der Coomassie-Stammlösungen 1 und 2. Die Färbung dauerte mindestens eine Stunde, wurde aber häufig über Nacht durchgeführt. Die Entfärbung erfolgte mit ddH_2O. Zur Beschleunigung des Entfärbens wurde gelegentlich erwärmtes Wasser (ca. 50-60°C) verwendet.

5.4.6.2 TCA-Fällung

Für die Aufkonzentrierung der Proteinproben für die SDS-Gelelektrophorese wurde häufig eine TCA-Fällung durchgeführt. Dazu wurde die Probe 1:1 mit einer 20 %igen TCA-Lösung. versetzt und bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Probe zentrifugiert und das Pellet in 1 ml gekühltem Aceton (-20°C) suspendiert und erneut zentrifugiert. Beide Zentrifugationen wurden unter denselben Bedingungen durchgeführt (20 min, 14.000 rpm, 4 °C). Nach der Zentrifugation wurde das Aceton abdekantiert und die Probe so lange getrocknet, bis das gesamte Aceton verdampft war. Die getrockneten Proben wurden dann für die SDS-Gelelektrophorese weiter bearbeitet.

5.4.7 Immunotransfer (Western Blot)

Bei einem Western Blot werden Proteine aus einem SDS-Page-Gel elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose oder PVDF-Membran übertragen. Auf der Membran lassen sich dann die Proteine immunologisch durch spezifische Antikörper nachweisen.

Als erstes wurde die Membran durch ein Bad in Methanol aktiviert. Dann wurde die Membran direkt auf das Gel gelegt und geschützt durch weitere beidseitige Schichten aus Papier- und Schaumstoff-Lagen in einer Kompressionskassette eingespannt. Dabei war zu beachten, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten gefangen waren. Nachdem die Kompressionskassette in die mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer eingehängt wurde, konnte die Elektrophorese gestartet werden. Beim Anschließen der Spannungsquelle musste beachtet werden, dass die Proteine im

elektrischen Feld in Richtung der Anode wandern. Deshalb musste sich die Membran zwischen dem Gel und der Anode befinden, da sonst die Proteine nicht auf die Membran übertragen wurden.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde der Transfer der Proteine durch eine reversible Färbung mit Ponceau S überprüft. Nach erfolgreichem Nachweis wurde die Membran für mindestens eine Stunde bei RT im Blockpuffer geschwenkt. Dann erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C. Nachdem die ungebundenen Antikörper durch Abgießen und durch ausgiebiges Waschen (10 x 5-10 min) mit Waschpuffer entfernt worden waren, erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus oder anti-Kaninchen) für eine Stunde bei RT. An den sekundären Antikörper war eine Peroxidase gebunden. Somit kommt es zur Chemolumineszenz, wenn Luminol durch die Peroxidase umgesetzt wird. So ließen sich durch Verwendung des Luminol haltigen Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Kits der Firma Roche die Antikörper und damit indirekt das gesuchte Protein nachweisen. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte durch Belichtung von Hyperfilm ECL der Firma Amersham.

5.4.8 Biotinylierung von EF_1

Für den fluoreszenzmikroskopischen Rotationstest wurde biotinyliertes EF_1 benötigt, da über das Biotin mittels Streptavidin ein biotinyliertes Aktinfilament an die γ-Untereinheit gebunden wird. Als Bindungstelle für das Biotin diente das einzige noch im EF_1 vorhandene Cystein, welcher sich an Position K108C der γ-Untereinheit befindet.

Bei der Biotinylierung wurden 2,9 mg EF_1 mit einer PD 10 Gelfiltrationssäule gegen den MKM-Puffer gelfiltriert. Zu dieser Lösung wurden dann 7,4 µl einer 20 mM Biotin-PEAC5-maleimid Lösung gegeben (dies entspricht einem 20fachen Überschuss) und 20 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 mM N-Acetylcystein beendet. Das EF_1 wurde dann im Anschluss mittels einer Ni-NTA-Chromatographie gereinigt, mit 25% Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

5.4.9 Fluoreszenzmikroskopischer Rotationstest

Mit dem Fluoreszenzmikroskopischen Rotationstest [12] lässt sich die Rotation der γ-Untereinheit im EF_1-Proteinkomplex optisch nachweisen. Dazu wird das EF_1 mit Hilfe des His-*tag* der β-Untereinheiten auf einem Objektträger fixiert und die Rotation durch die Bewegung des Actin-Filaments, welches mit der γ-Untereinheit verbunden ist, nachgewiesen. Diese Beobachtung wird mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. In Abbildung 5-7 ist der Rotationstest schematisch dargestellt.

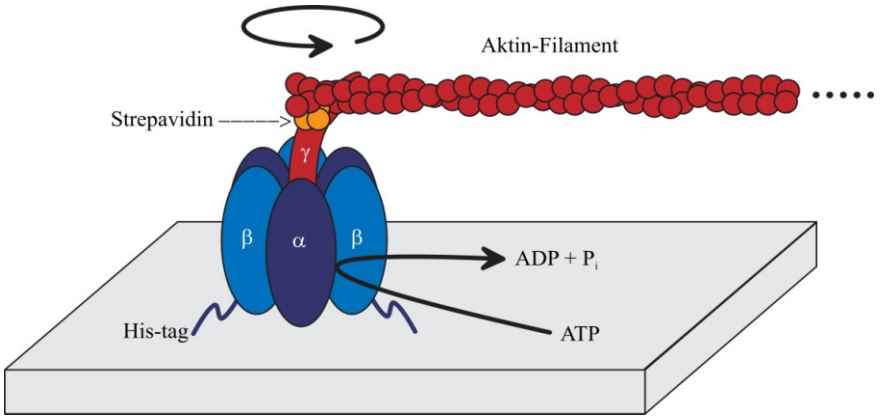


Abbildung 5-7: Schematische Darstellung des fluoreszenzmikroskopischen Rotationstests

Das EF_1 ist mit den His-tags der β-Untereinheit auf dem Objektträger fixiert. Durch die Hydrolyse von ATP wird die γ-Untereinheit in Rotation gebracht. Das mit der γ-Untereinheit verbundene Aktinfilament wird dadurch ebenfalls in eine rotierende Bewegung gebracht. Die Bewegung dieses Filaments kann dann mit Hilfe eines Mikroskops beobachtet werden. (nach Winkler 2001) [53] Die für den Versuch benötigten Durchflussküvetten wurden wie folgt hergestellt: Ein Deckglas wird mit zwei Streifen doppelseitigem Klebeband so auf einen Objektträger geklebt, dass in der Lücke zwischen den beiden Klebestreifen, dem Deckglas und dem Objektträger eine Art Durchflussküvette gebildet wird (Abbildung 5-8).

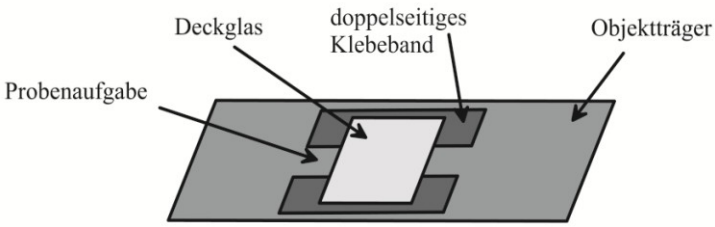


Abbildung 5-8: Aufbau der Durchflussküvette

(nach Müller 2004) [34]

Im Experiment wurden dann die verschiedenen Lösungen an die eine Öffnung der Durchflussküvette (Probenaufgabe) pipettiert und von der anderen Öffnung der Küvette mit einem Filterpapier aufgesaugt. Auf diese Weise entstand ein Flüssigkeitsstrom, der dafür sorgte, dass die verschiedenen Lösungen durch die Küvette flossen und sich gleichmäßig verteilten. Die Immobilisierung des EF_1/Funktionalisierung der Glasoberfläche ist in Abbildung 5-9 (nach Oliver Pänke, Handout) illustriert. In Tabelle 5.8 ist das Pipettierschema des Versuches angegeben.

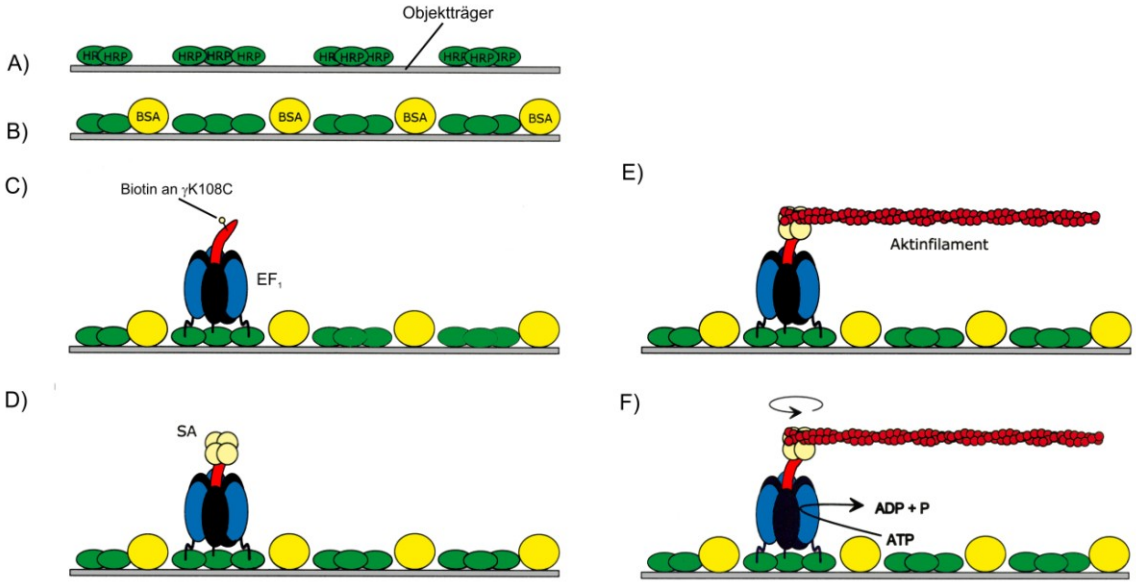


Abbildung 5-9: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte des Rotationstests

Als erstes wurde der Objektträger (= der Boden der Durchflussküvette) mit Ni-NTA-Meerrettich-Peroxidase beschichtet (A). Die danach noch freien Protein-Bindungsstellen wurden dann mit BSA aus dem BMKM-Puffer abgesättigt (B). Anschließend wurde das EF_1 an die Ni-NTA-Meerrettich-Peroxidase gebunden, u. a. diesem Zweck dienten die His-*tags* der drei β-Untereinheiten (C). Da das γK108C des für dieses Experiment verwendeten EF_1 zuvor biotinyliert worden war, konnte im nächsten Schritt Streptavidin mit seiner hohen Affinität für Biotin an das Biotin binden (D). Streptavidin liegt als sehr stabiles Homotetramer vor, enthält also insgesamt 4 Biotin-Bindungsstellen. Als letzter vorbereitender Schritt wurde ein ebenfalls biotinyliertes und außerdem mit dem Fluoreszenzfarbstoff TMR gefärbtes Aktinfilament über das Streptavidin an die γ-Untereinheit des EF_1 gebunden (E). Die Aktinfilamente waren vorher durch mehrmaliges Pipettieren durch 200 µl Pipettenspitzen infolge der dabei auftretenden Scherkräfte auf eine Länge von etwa 1 µm gebracht worden. Zu lange Filamente hätten die Rotation blockiert.

Tabelle 5.8: Pipettierschema für den fluoreszenzmikroskopischen Rotationstest

	Volumen	*Komponente*	*Inkubationszeit [min]*
1.	50 µl	0,8 µM Ni-NTA-HRP in MKM-Puffer	4
2.	50 µl	BMKM-Puffer	4
3.	50 µl	Spülung mit MKM-Puffer	-
4.	50 µl	EF_1 in MKM-Puffer	4
5.	50 µl	Spülung mit MKM-Puffer	-
6.	50 µl	0,5 µM Strepavidin in MKM	4
7.	50 µl	Spülung mit MKM-Puffer	-
8.	50 µl	200 nM F-Actin in MKM-Puffer	7
9.	50 µl	Spülung mit MKM-Puffer	-
10.	50 µl	OSS (Oxygen Scavenger System) 20 mM Glucose; 0,2 mg/ml Glucoseoxidase; 50 µg/ml Katalase; 0,5% ß-Mercaptoethanol + 5 mM ATP	-

Die ATP-Hydrolyse und somit die Rotation von γ relativ zum immobilisierten $(\alpha\beta)_3$ wurde durch Zugabe von ATP gestartet. Dazu wurde ein MKM-Puffer verwendet, der außer ATP auch ein Sauerstoff-verbrauchendes System enthielt. Das war notwendig, damit die Oxidation des Fluoreszenzfarbstoffes verlangsamt und somit die Beobachtungszeit verlängert wurde. Das Sauerstoff-verbrauchende System bestand aus Glucose, Glucoseoxidase und Katalase.

Die Glucoseoxidase reagiert unter Sauerstoff-Verbrauch mit Glucose und zu Gluconolacton und Wasserstoffperoxid. Das Wasserstoffperoxid wird durch Katalase zu Wasser und Sauerstoff disproportioniert. Die Neubildung von Sauerstoff mag erstaunen, da die Zusätze schließlich den Sauerstoff entfernen sollen. Die Reaktionsgleichungen (Abbildung 5-10) zeigen jedoch, dass bei der Oxidation der Glucose zwei O_2 verbraucht werden, bei der Reduktion des Wasserstoffperoxids jedoch nur ein O_2 gebildet wird. Daher wird doppelt so viel O_2 gebunden wie freigesetzt wird.

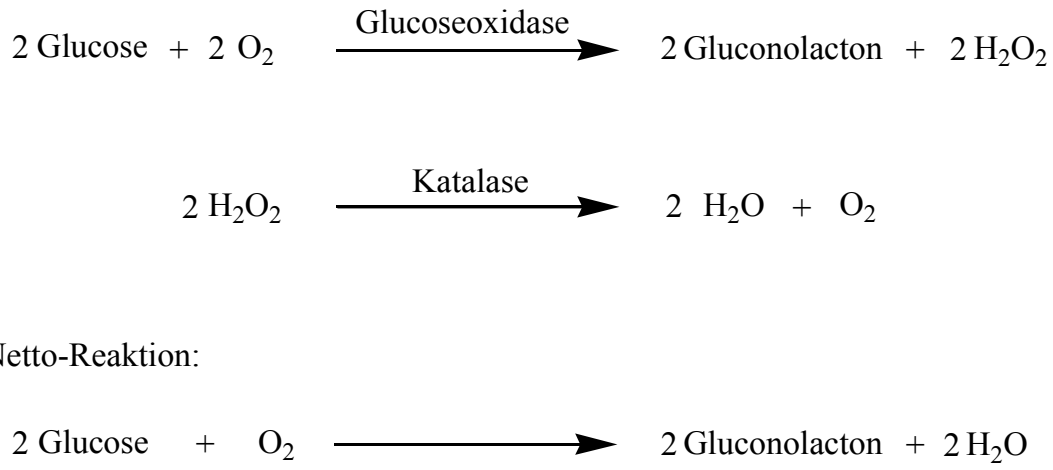


Abbildung 5-10: Reaktionsgleichungen des Sauerstoff verbrauchenden Systems

Nach Zugabe des ATP-haltigen Puffers wurde im Mikroskop nach rotierenden Filamenten und somit nach aktiven Einzelenzymmolekülen gesucht. Aufgefundene „Rotatoren‘‘ wurden mittels Videoaufnahme dokumentiert.

5.5 Peptidsynthese

5.5.1

5.5.2 Pam-Linker Synthese

Aminomethylharz wurde 10 min in DMF gequollen. Dabei war eine Volumenzunahme um ca. das Vierfache festzustellen. In Abbildung 5-11 werden das trockene Harz, sowie das aufgequollene Harz gezeigt.

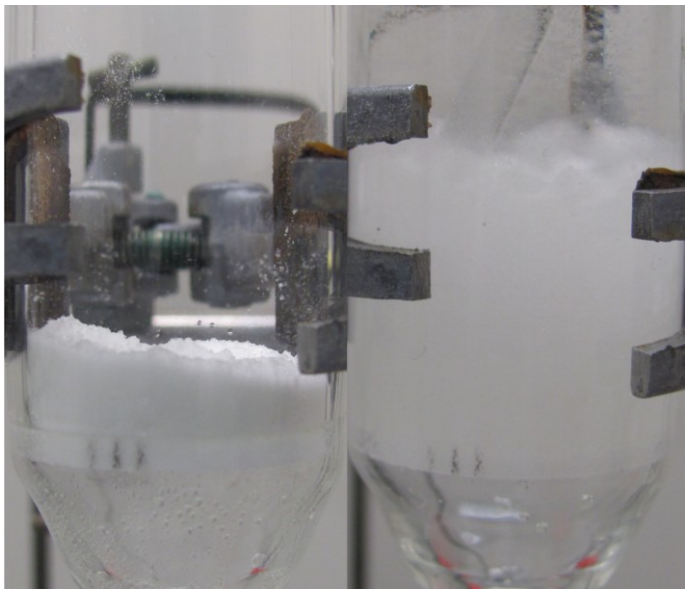


Abbildung 5-11: Volumenzunahme beim Quellen des Aminomethylharzes

Links, das trockene Harz. Rechts, das gequollene Harz.

Das Harz wurde dann mit einer Mischung aus 2 äquimolaren Teilen N,N-Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 2 äquimolaren Teilen des gewünschten Boc-AS-Pam-Linkers in 5 ml Dichlormethan (nach 5 minütiger Reaktion dieser Mischung) umgesetzt. Die erfolgreiche Kopplung des Pam-Linkers wurde durch einen negativen Ninhydrin-Test nachgewiesen, da durch die Kopplung die freien Amino-Gruppen des Harzes abgesättigt werden. Der Reaktionsschritt ist in Abbildung 5-12 dargestellt.

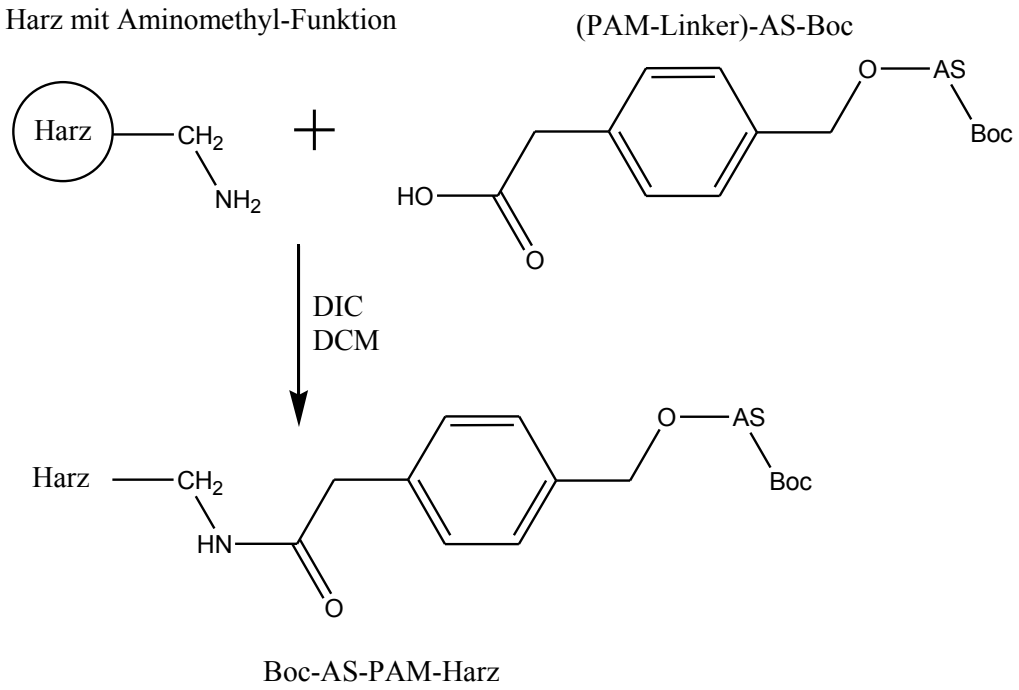


Abbildung 5-12: Kopplung des PAM-Linkers an das Aminomethylharz

5.5.3 Thioestersynthese

Das Boc-AS-Pam-Harz wurde mit Trifluoressigsäure (TFA) (2 x 1min) entschützt. Anschließend wurde S-Trityl-ß-Mercaptopropionsäure (der spätere Thioester) in derselben Weise gekoppelt wie eine Boc-Aminosäure. Lediglich die Kopplungszeit wurde auf 20 min erhöht. Die erfolgreiche Kopplung wurde durch einen negativen Ninhydrin-Test nachgewiesen. Der Thioester wurde dann für die Kopplung der ersten Aminosäure mit einer Mischung aus 2,5 % Triisopropylsilan (TIPS), 2,5 % H_2O und 95 % TFA entschützt (1x 1min waschen, dann 2x 1min einwirken lassen). Die Entschützung war erfolgreich, wenn die während der Reaktion entstandene gelbe Färbung des Harzes, durch Spülen mit der Reaktionsmischung entfernt wurde. Die

gelbe Färbung ist durch die abgespaltene Trityl-Schutzgruppe bedingt. Zum Abschluss wurde das Harz dann mit DMF gewaschen. Nach erfolgreichem Entschützen wurde die erste Aminosäure wie gewohnt gekoppelt, lediglich die Kopplungszeit wurde auf eine Stunde erhöht. Die einzelnen Reaktionsschritte sind in Abbildung 5-13 gezeigt.

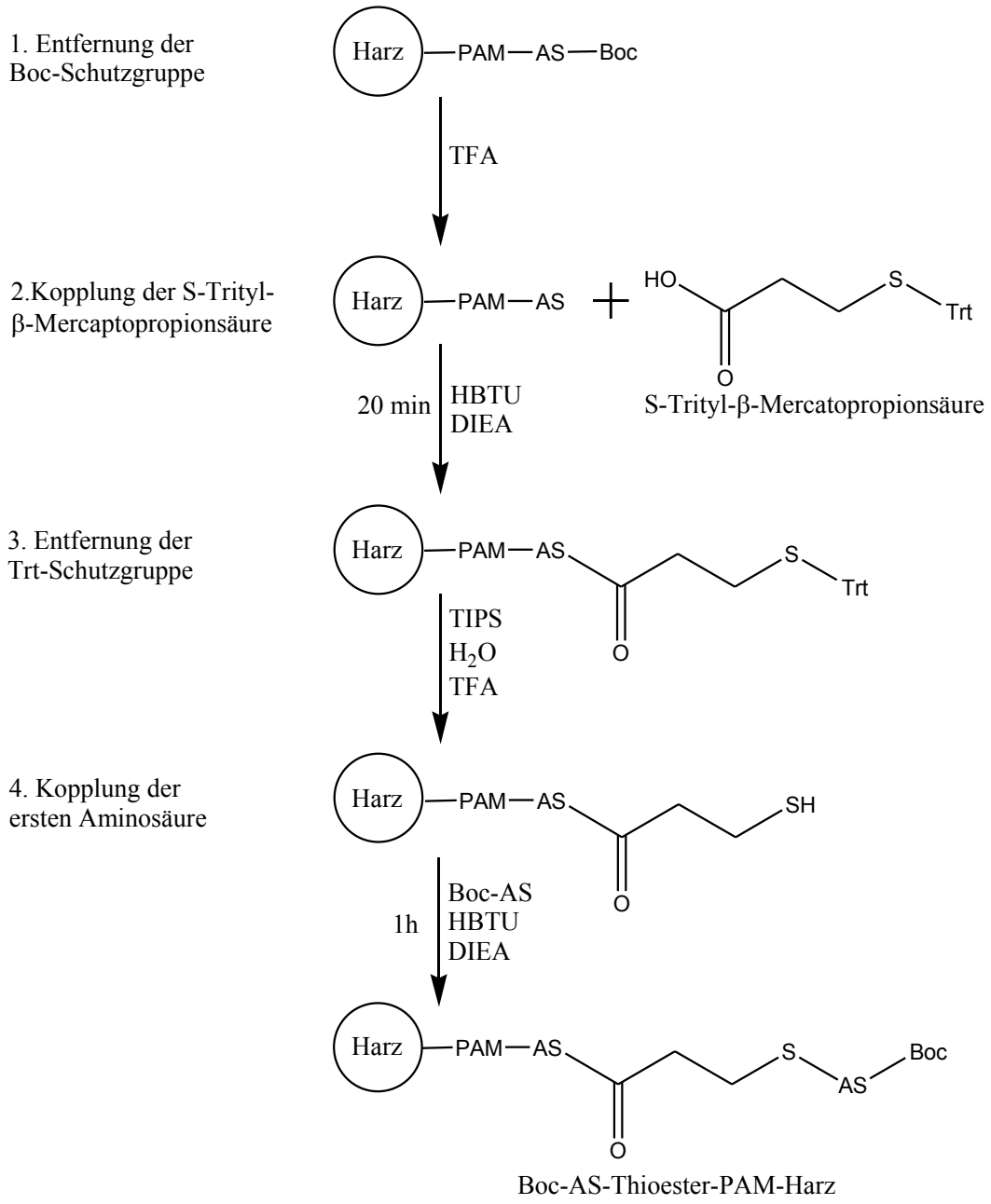


Abbildung 5-13: Die Thioestersynthese ausgehend vom Boc-AS-PAM-Harz

5.5.4 Peptidsynthese

Aus Gründen der besseren Verständlichkeit der einzelnen Arbeitsschritte der Peptidsynthese werden diese in folgendem Flussdiagram (Abbildung 5-14) zusammengefasst:

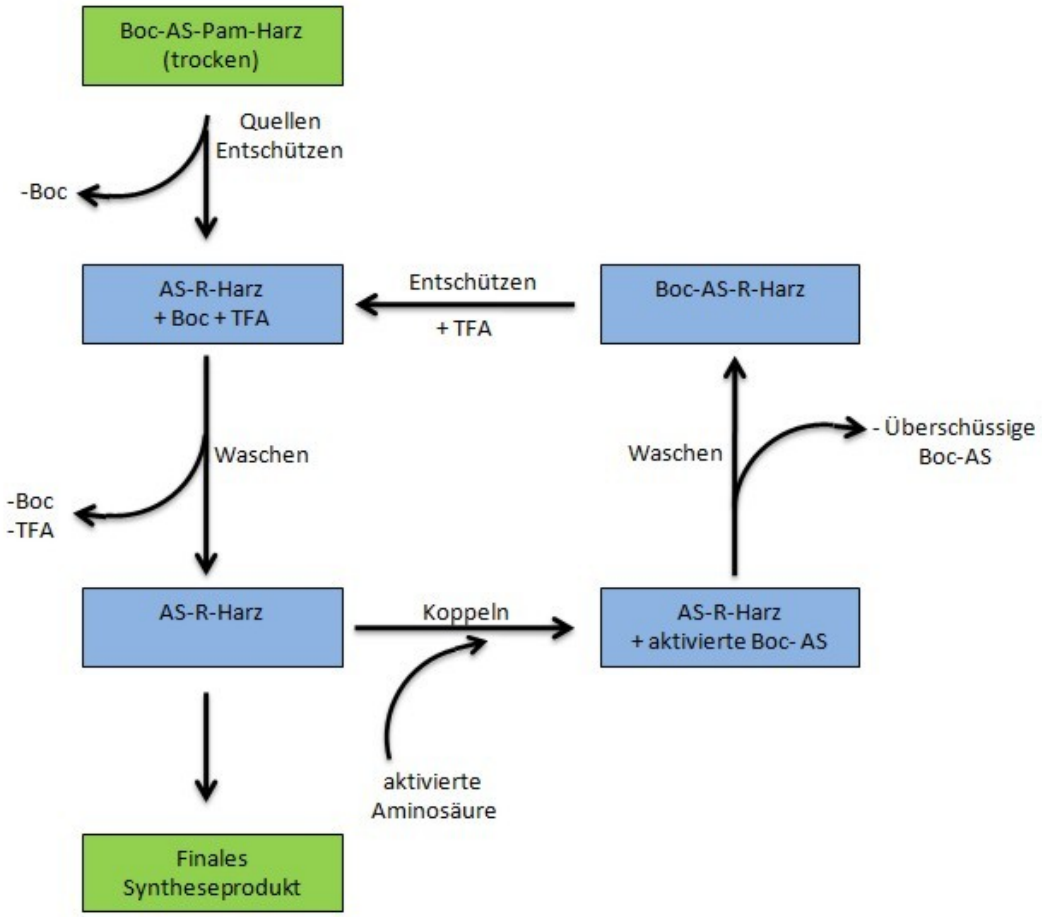


Abbildung 5-14: Flussdiagram der Peptidsynthese

Die Peptidsynthese startet mit dem Quellen und Entschützen des Syntheseharzes. Dann folgt der Synthesezyklus (Waschen, Koppeln Waschen, Entschützen). Nach Beendigung der Synthese erfolgt die Abspaltung des Syntheseproduktes vom Harz mit Hilfe von HF.

Entschützen der Boc geschützten Aminofunktion

Die Boc-Schutzgruppe wird durch ein kurzes und schnelles Waschen mit TFA (Entfernen des restlichen DMF und schnelle Abführung der für das Produkt kritischen

Reaktionswärme der Reaktion zwischen DMF und TFA) und durch zweimaliges kurzzeitiges Einwirken von TFA für jeweils eine Minute entfernt. Vor der nächsten Kopplung wurde die TFA durch ausgiebiges Waschen mit DMF entfernt.

Aktivierung und Kopplung der Boc-Aminosäure

Als erstes wurde die benötigte Boc-Aminosäure in der HBTU Lösung (0,5 M in DMF) gelöst. Dabei wurden die Boc-Aminosäure in einem 5,5fachen Überschuss und das HBTU in 5fachem Überschuss verwendet. Der geringere Überschuss an HBTU sollte sicherstellen, dass das gesamte HBTU während der Aktivierung abreagierte und später nicht die Synthese störte. Kurz vor der Überführung in das Reaktionsgefäß wurde die Lösung mit Hilfe von N-Ethyldiisopropylamin (DIEA) neutralisiert. Für eine 0,1 mmol Synthese wurden 0,25 ml DIEA benötigt. Nachdem das DIEA zugefügt wurde, muss die Lösung unverzüglich (innerhalb von 30 sec) in das Reaktionsgefäß überführt werden, da es zu einer chemischen Umlagerung innerhalb des HBTU kommt, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich sinkt. Nachdem die Lösung vollständig überführt worden war, wurde das Harz-Lösungsmittel-Gemisch vorsichtig mit einem Glasstab umgerührt und die Kopplung für 12 Minuten fortgesetzt. Auf Doppel-Kopplungen mit derselben Aminosäure konnte verzichtet werden, da das die Ausbeuten nicht signifikant verbesserte. Zudem wurde die Kopplungszeit auch nur unwesentlich von 12 auf 15 Minuten ab der dreißigsten Kopplung verlängert, da eine deutliche Verlängerung auf z.B. eine halbe Stunde ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbeuten hatte. Im Verlauf der Synthese kommt es durch die wachsende Peptidkette zur deutlichen Volumenzunahme des Harzes (Siehe Abbildung 5-15).

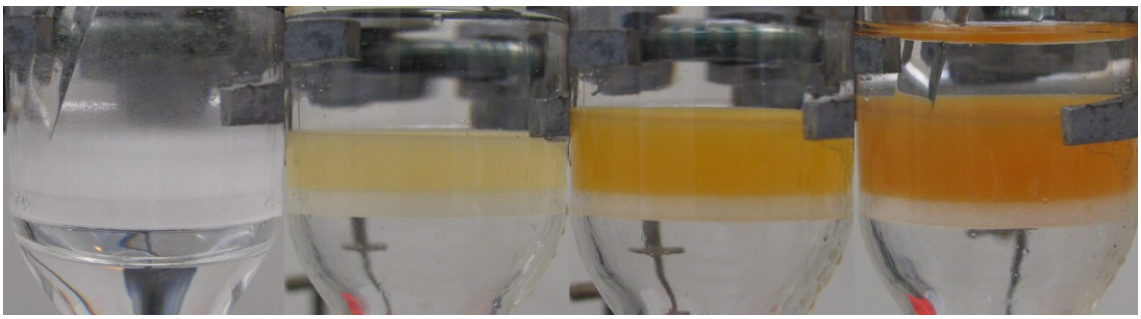


Abbildung 5-15: Volumenzuwachs während der Synthese am Beispiel des Peptides 6

Das Reaktionsgefäß wurde zu Beginn, nach 20, nach 37 und nach 49 Kopplungen fotografiert (von links nach rechts). Es ist eine deutliche Zunahme des Volumens sowie eine Intensivierung der Färbung feststellbar.

5.5.5 Ninhydrin-Test

Für den Nachweis von freien Aminofunktionen während der Peptidsynthese wurde der Ninhydrin-Test (auch Kaiser-Test genannt) [54] verwendet . Dieser Test beruht auf der Bildung eines blauen Farbstoffes (Ruhemanns Blau) aus Ninhydrin in Anwesenheit von freien Aminofunktionen. Der Reaktionsmechanismus wird in Abbildung 5-16 gezeigt.

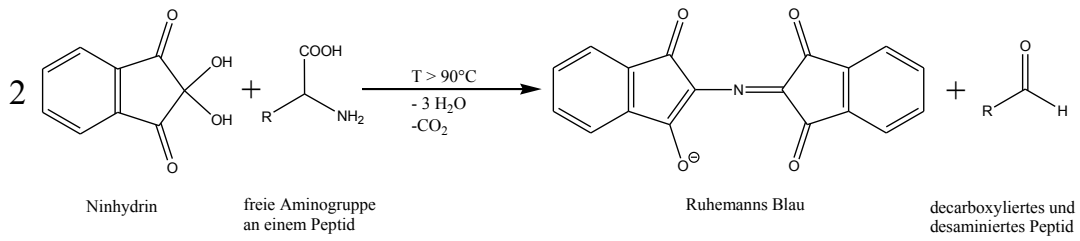


Abbildung 5-16: Reaktion des Ninhydrins in Anwesenheit von freien Aminofunktionen.

Für den Test wurde eine Spatelspitze der zu untersuchenden Probe mit jeweils 30 µl der folgenden Lösungen versetzt:

Lösung A : 1 ml 0,01 mM $KCN_{(aq)}$ + 49 ml Pyridin

Lösung B : 40 g Phenol gelöst in 10 ml Ethanol

Lösung C : 2,5 g Ninhydrin gelöst in 50 ml Ethanol

Das Gemisch wurde dann auf ca. 95°C erhitzt. Eine blau-violette Färbung der Lösung zeigte das Vorhandensein von freien Aminofunktionen an, was mit einer unvollständigen Kopplung während der Synthese gleichzusetzen ist. War der Test negativ, zeigte sich nur eine schwache Rosafärbung der Lösung. Der Unterschied ist aus Abbildung 5-17 ersichtlich.

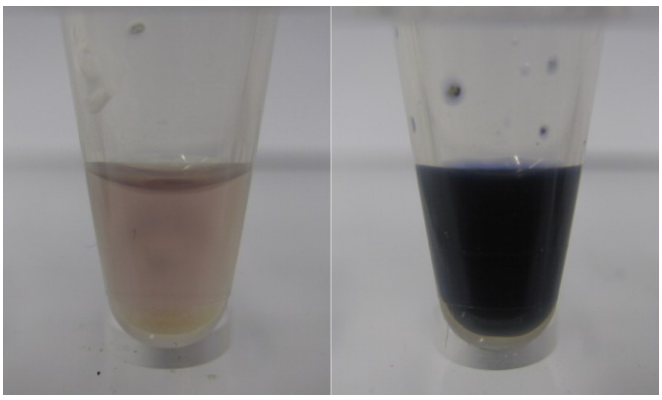


Abbildung 5-17: Negativer und positiver Ninhydrin-Test

5.5.6 HF-Abspaltung

Die terminale Boc-Schutzgruppe des abzuspaltenden Peptides wurde frühestens einen Tag vor der geplanten HF-Abspaltung entfernt, da es sonst Probleme beim Abspalten gab. Das im Exsikkator getrocknete Harz wurde in ein Teflon-Reaktionsgefäß der HF-Abspaltungs-Apparatur überführt und mit p-Cresol versetzt (0,5 ml für < 1 g Harz) und an die Apparatur angeschlossen. Um die mögliche Gefährdung durch HF auszuschließen, musste zunächst die Dichtigkeit der Abspaltungs-Apparatur festgestellt werden. Dazu wurde die Apparatur unter Vakuum gesetzt und geprüft, ob der Unterdruck über eine längere Zeit (20 min) stabil blieb. War dies der Fall, wurden die Reaktionsgefäße mit Hilfe eines Trockeneis/Ethanol-Kältegemisches mindestens eine halbe Stunde lang vorgekühlt.

Nachdem ca. 10 ml HF in die Reaktionsgefäße einkondensiert waren, wurde das Trockeneis/Ethanol-Kältegemisch entfernt und gegen ein Eisbad ausgetauscht. Nach einstündigem Rühren bei 0°C wurde das HF unter Vakuum entfernt, in einer CaO-Falle gebunden und somit unschädlich gemacht. Durch das vorsichtige Eintropfen einiger Tropfen Ether in die abgeschraubten Reaktionsgefäße wurde überprüft, ob das HF vollständig entfernt wurde. Ggf. würde durch den Ether das restliche HF aus der Probe verdampfen und als weißlicher Nebel sichtbar werden.

Im Anschluss wurde das Peptid-Harz-Gemisch in ca. 30 ml kaltem Diethylether suspendiert. Diese Suspension wurde dann über eine feine Teflon-Fritte abfiltriert und der Filterkuchen mit Diethylether gespült um restliches p-Cresol und die bei der Abspaltung gleichzeitig abgespaltenen Schutzgruppen zu entfernen. Aus diesem Filterkuchen wurde nun das Peptid mit Hilfe einer Acetonitril-Lösung (50 % Acetonitril/50 % H_2O, 0,1 % TFA) herausgelöst. Das Lösungsmittel wurde mittels Gefriertrocknung entfernt und das Rohpeptid bis zur Aufreinigung bei -20 °C gelagert.

5.6 Peptidpräparation

5.6.1 Lösen der lyophilisierten Rohpeptide

Die Rohpeptide wurden mittels Reversed-Phase-HPLC aufgereinigt. Die Peptide lagen in lyophilisierter Form vor und mussten deshalb vor der Chromatographie gelöst werden. Als Lösungsmittel für den Probenauftrag wurden verschiedene Acetonitril/Wasser-Gemische getestet. Dabei war zu beachten, dass die Acetonitril-Konzentration nicht größer als 50% war, da sonst die Möglichkeit bestand, dass das

Peptid infolge der zu hohen Acetonitril-Konzentration nicht mehr an die Matrix gebunden wurde.

Die Peptide waren häufig in diesen Gemischen schlecht löslich. Das bedingte ein großes Probevolumen (bis zu 60 ml bei 200 mg Probe). Gelegentlich fielen die Peptide trotzdem wieder aus, daher wurde ein anderes Lösungsmittel gesucht. Als beste Alternative erwies sich eine 6 M GdnHCl-Lösung. Damit konnte das Probenvolumen deutlich verkleinert werden (ca. 20 ml bei 200 mg Probe) und es wurde kein späteres Ausfallen der Peptide mehr festgestellt.

5.6.2 Probenauftrag

Der Probenauftrag erfolgte über den Autosampler der HPLC oder bei größeren Probemengen über eine 10 ml Edelstahl-Probenschleife, die mit Hilfe eines 6-Wege-Ventils zwischen Pumpe und Säule geschaltet wurde. Die Flussrate wurde hierbei während des Probeauftrages wegen der deutlich größeren Viskosität des GdnHCl im Vergleich zu den Acetonitril/Wasser-Gemischen und um sicher zu gehen, dass alles Peptid an die Säule gebunden wurde, auf die Hälfte der Flussrate der späteren Chromatographie reduziert.

Nach dem Probeauftrag wurde die Säule so lange gespült, bis die UV-Absorption wieder deutlich gefallen war. Der null-UV-Wert vor dem Probeauftrag wurde meist nicht wieder erreicht, aber die Absorption pendelte sich auf einen konstanten Wert ein, der etwas höher lag als der anfängliche Nullwert. Nach Beendigung des Probenauftrages wurde dann die eigentliche Chromatographie gestartet.

5.6.3 Peptidreinigung am Beispiel des Peptides 5

Im folgenden Abschnitt werden die Schritte der Reinigung des Peptides 5 vom Roh-Peptid bis zum reinen Peptid beschrieben.

Jede Reinigung startete mit der Betrachtung und Auswertung einer HPLC-Analyse der abgespaltenen Rohpeptide. Bei den Analysen der Rohpeptide aller meiner Synthesen bildete das gesuchte Produkt immer den größten Peak. Beim Betrachten des Chromatogramms vom Peptid 5-Rohprodukt (Abbildung 5-18) sah man einen großen Peak, der das gesuchte Produkt enthielt und weitere Peaks, die durch Verunreinigungen hervorgerufen wurden.

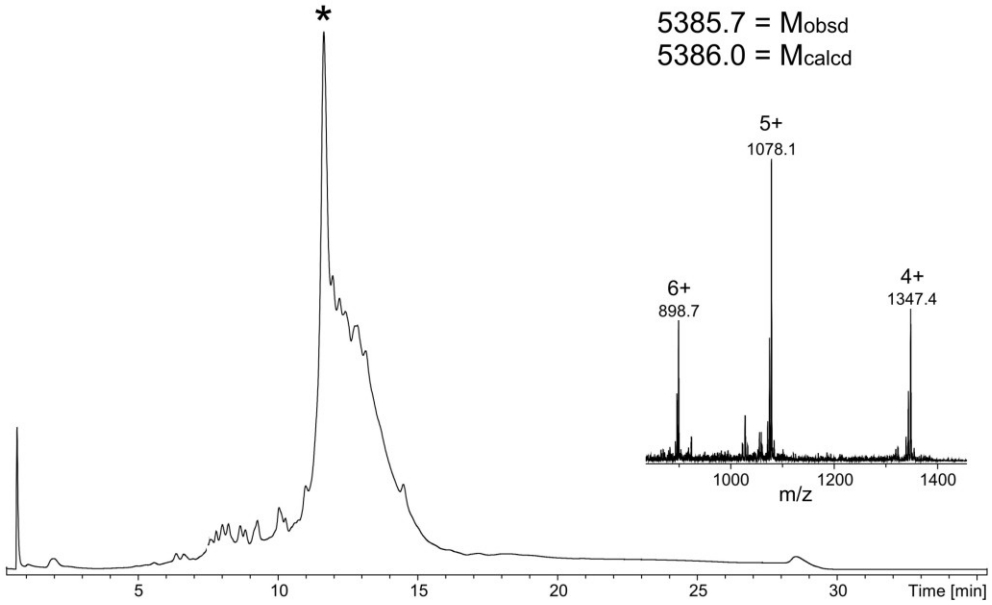


Abbildung 5-18: Analytische HPLC-MS-Chromatographie des Syntheseproduktes von Peptid 5

UV-Chromatogramm (211nm). Der Stern in der Abbildung markiert den Produkt-Peak. Linearer Gradient von 0-100% Puffer B in 23 min bei RT. Puffer A : 0,1% TFA in 20% Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08% TFA in Acetonitril. Das eingeschobene Massenspektrum zeigt das ESI-MS des Produkt-Peaks. Die Massenberechnung erfolgte mit den durchschnittlichen Isotopenmassen.

Für die präparative Chromatographie mussten eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt werden, mit deren Hilfe der benötigte Gradient für die Reinigung bestimmt wurde. Der Gradient war die einzige Variable, die verändert wurde, da immer dieselbe Säule und dieselbe Elutionsgeschwindigkeit (5ml/min) verwendet wurden.

Als erstes wurde eine analytische Chromatographie einer kleinen Menge (1 mg) des Rohproduktes mit einem Test-Gradienten durchgeführt. Anfangs startete ein schneller Wasch- Gradient mit 1% Puffer B/min. Dieser Gradient endete bei 10% B unterhalb der Konzentration, bei der das Produkt desorbiert worden wäre. Jetzt wurde die Konzentration von B für 10 min konstant gehalten. Dies sollte dafür sorgen, dass die Säule ausreichend gespült wurde. Danach wurde die Konzentration von Puffer B erneut langsam erhöht, deutlich flacher als zuvor beim Waschen. Die Steigerung betrug jetzt nur noch 1/2 % bis ca. 1/8 % B pro Minute. Die Steigung richtete sich nach der Reinheit des Rohproduktes. Wenn das Rohprodukt schon relativ rein war, reichte ein schneller Gradient (1/2-1/4 % B pro Minute). Anderenfalls musste der Gradient noch flacher gewählt werden, damit die verschiedenen Substanzen effektiv getrennt wurden. Durch diese Test-Chromatographien wurde ein ungefährer Eindruck der Effektivität des verwendeten Gradienten erhalten. Ziel war die möglichst gute Trennung des Produktpeaks von Verunreinigungspeaks. Diese Vorgehensweise wurde ggf. iterativ so lange fortgesetzt, bis das Ergebnis zufriedenstellend war.

In Abbildung 5-19 ist eine analytische Chromatographie gezeigt. Die Einkästelung markiert den Produktpeak, der hier deutlich von den später eluierenden Verunreinigungen getrennt ist.

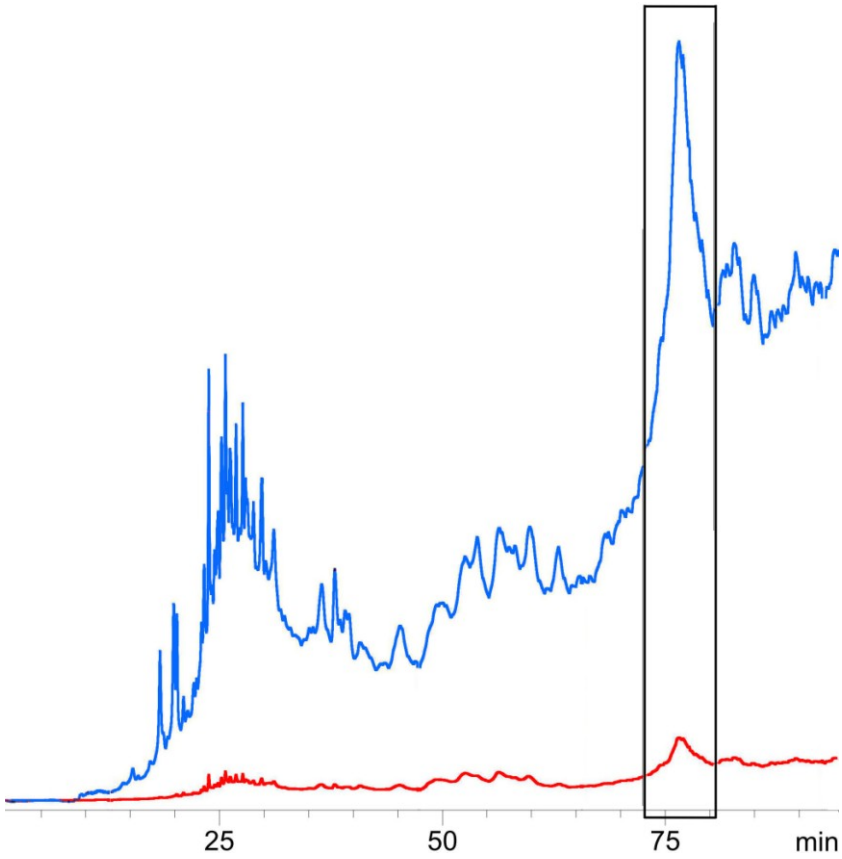


Abbildung 5-19: Analytischer HPLC-Lauf mit Peptid 5 Rohprodukt

UV-Chromatogramm (blau: 210nm, rot: 254nm). Der Produkt-Peak ist eingekästelt. Grace-Vydac C4 Säule (10 X 250 mm). Flussrate 5 ml/min. Probenmenge : 1 mg. Erster linearer Gradient von 10-20 % Puffer B in 10 min, dann zweiter linearer Gradient von 20-35 % Puffer B in 105 min (1/7 % B/min) bei 40 °C. Puffer A : 0,1 % TFA in 10 % Acetonitril/H_2O. Puffer B : 0,08 % TFA in Acetonitril.

Nach dieser Optimierung wurde die präparative Chromatographie durchgeführt. Bei Chromatographien mit einer 10 x 250 mm Säule erwies sich eine Probemenge von 150-200 mg als optimal. Es durften jedoch nicht deutlich mehr als 200 mg Rohpeptid eingesetzt werden, da sonst die Kapazität der Säule überschritten wurde.

Die aus den analytischen Chromatogrammen bekannte Retentionszeit ließ sich nicht auf die präparativen Chromatographien übertragen. Zwar verwendete man dieselben Parameter, aber durch die großen Mengen an Probenmaterial auf der Säule und die dadurch eintretenden Effekte verschoben sich die Retentionszeiten deutlich nach vorne. Um die Produktfraktionen zu bestimmen war die Beobachtung des Chromatogramms während der Reinigung häufig keine Hilfe, da die Absorption bei 210 nm in der

Sättigung lag und das Chromatogramm bei 254 oder 280 nm häufig ebenfalls keine Anhaltspunkte lieferte.

Diese Verschiebung der Retentionszeit konnte durchaus 20 min und mehr betragen. Deshalb sollte bei der ersten Chromatographie möglichst alles aufgefangen werden, was von der Säule eluierte, um zu verhindern, dass man etwas vom Produkt verlor. In Abbildung 5-20 ist die Chromatographie einer typischen präparativen Reinigung zu sehen. Wenn man die Retentionszeit des Produktes während dieser Chromatographie (ca. 54-59) mit der Retentionszeit in der analytischen Chromatographie vergleicht (Abbildung 5-19), ist ersichtlich, dass das Produkt in diesem Fall 18 min früher eluierte. Bei späteren Wiederholungen genau dieser Chromatographie, reichte es aus, wenn man von 10 min vor der Retentionszeit bis 10 min nach der Retentionszeit sammelte.

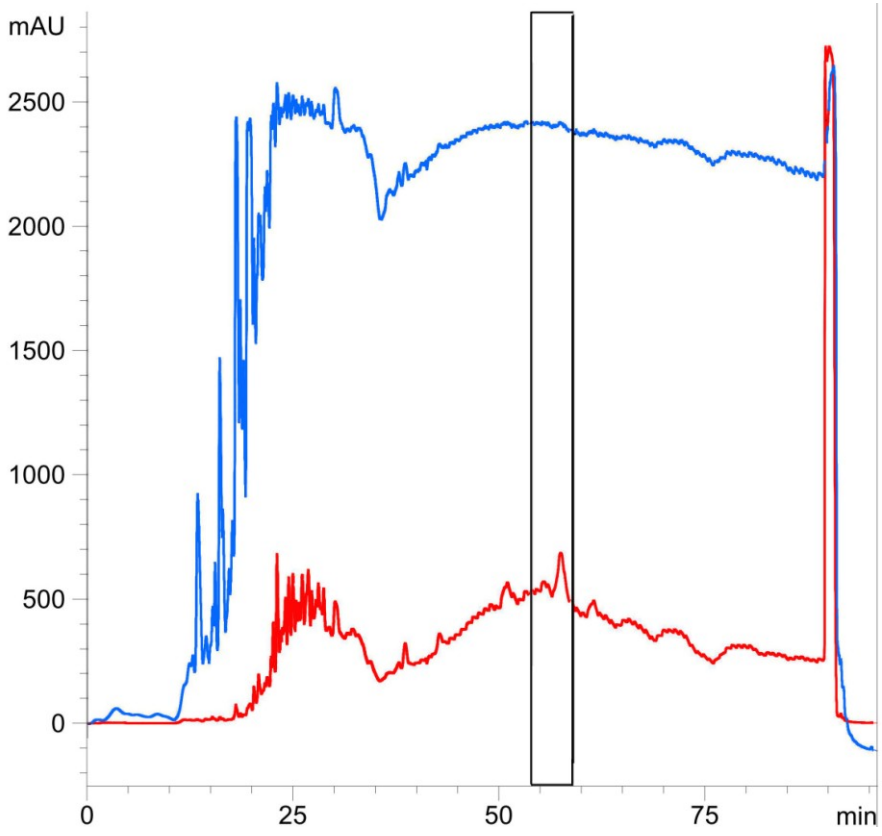


Abbildung 5-20: Präparativer HPLC-Lauf mit Peptid 5 Rohprodukt

UV-Chromatogramm (blau: 210nm, rot: 254nm). Der Kasten in der Abbildung markiert den Produkt-Peak. Grace-Vydac C4 Säule (10 X 250 mm). Flussrate 5 ml/min. Probenmenge: 180 mg. Erster linearer Gradient von 10-20 % Puffer B in 10 min, dann zweiter linearer Gradient von 20-35 % Puffer B in 105 min (1/7 % B pro min), bei 40 °C. Puffer A : 0,1 % TFA in 10 % Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08 % TFA in Acetonitril.

Infolge der ausgeprägten Retentionszeitverschiebungen war als Nächstes eine Analyse der gesammelten Fraktionen mittels HPLC erforderlich. Die gesuchten Fraktionen mit dem Produkt ließen sich relativ schnell finden, indem man die Chromatogramme der

einzelnen Fraktionen in einer Auswerte-Software übereinander legte und sie verglich. Stets waren einige Chromatogramme bzgl. Form und Retentionszeit nahezu identisch. In diesen Fraktionen befand sich mit großer Wahrscheinlichkeit das Produkt. Allein durch die Form und Größe der Peaks der einzelnen Chromatogramme ließen sich der Produkt-Fraktionen bis auf ein bis zwei Fraktionen genau bestimmen. In Abbildung 5-21 sind die Fraktionen F12–27 und die Fraktionen F18-23 in je einer Abbildung zusammengefasst. In der Abbildung mit allen Chromatogrammen (F12-27) sieht man deutlich einige Chromatogramme, die annähernd parallel verlaufen. Diese ähnlichen Chromatogramme (F18-23) sind dann in der zweiten Abbildung zusammengefasst.

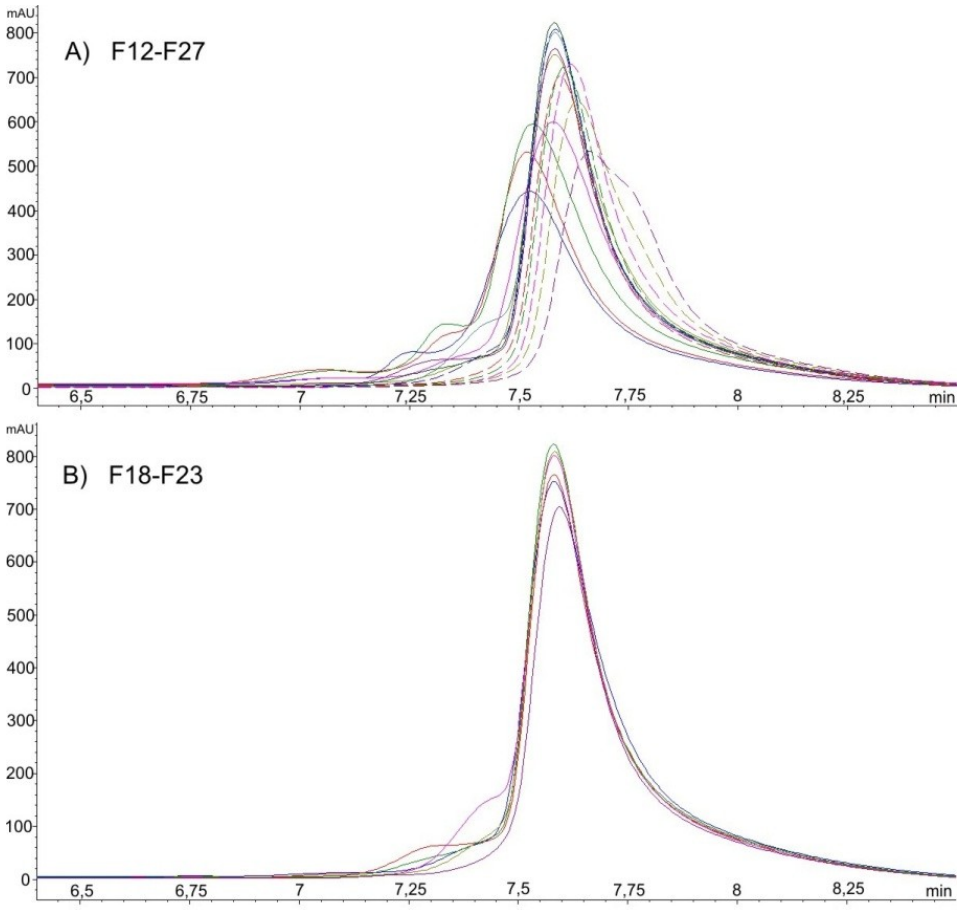


Abbildung 5-21: Fraktionen des präparativen HPLC-Laufes mit Peptid 5 Rohprodukt

A) Fraktionen F12-F27. UV-Chromatogramme (210nm). Linearer Gradient von 11-56 % Puffer B in 10 min bei 40 °C. Puffer A : 0,1 % TFA in 10 % Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08 % TFA in Acetonitril.

B) Fraktionen F18-F23. UV-Chromatogramme (210nm). Linearer Gradient von 11-56 % Puffer B in 10 min bei 40 °C. Puffer A : 0,1 % TFA in 10 % Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08 % TFA in Acetonitril.

Um nachzuweisen, ob das Produkt sich in den vermuteten Fraktionen befand, wurden sie mittels HPLC-MS untersucht. Auf der Grundlage dieser Analysen wurden dann die Fraktionen ausgewählt, vereinigt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Probe wurde dann entweder sofort gefriergetrocknet oder bei -80°C gelagert. In Abbildung 5-22 sind die Chromatogramme des Rohproduktes mit dem des Produkt-Pools übereinander gelegt. In der Abbildung sieht man deutlich die hohe Reinheit der vereinigten Fraktionen. Der Produktpeak im Rohprodukt hat dieselbe Retentionszeit wie das gereinigte Produkt.

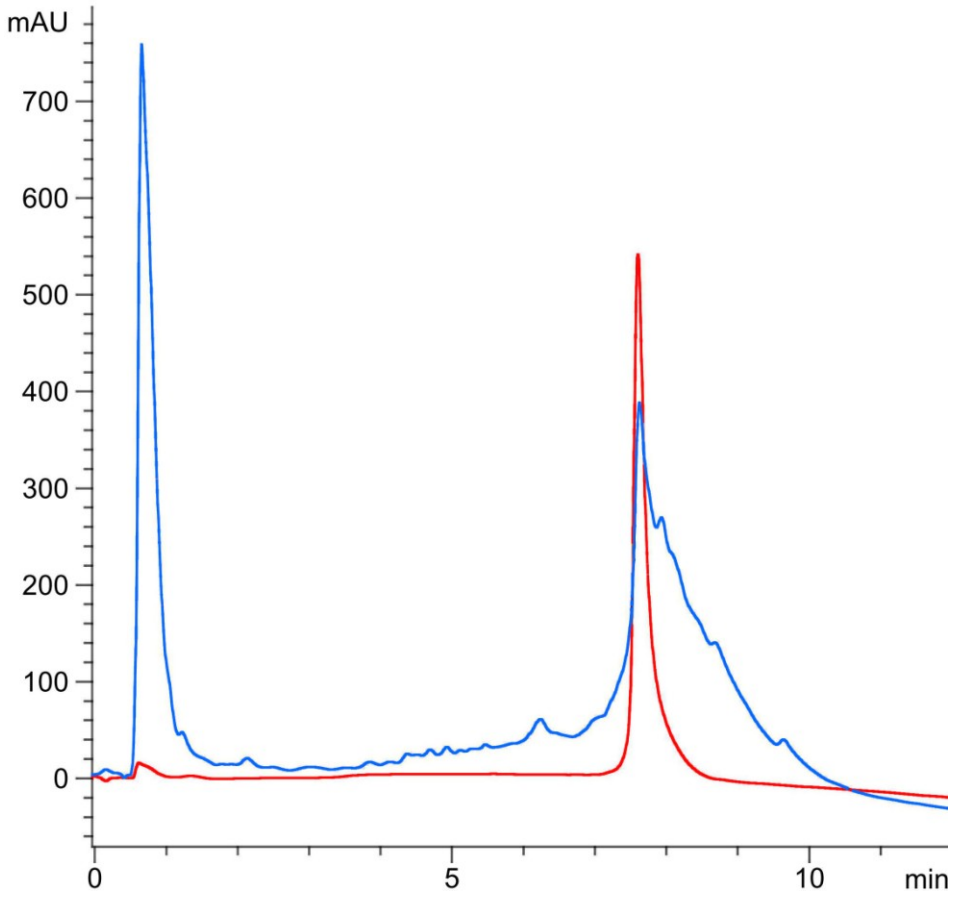


Abbildung 5-22: Analytische HPLC-Läufe mit den vereinigten Fraktionen und dem Rohprodukt

Blau: Rohprodukt. Rot : vereinigte Fraktionen. UV-Chromatogramme (210nm). Linearer Gradient von 11-56 % Puffer B in 10 min bei 40 °C. Puffer A : 0,1 % TFA in 10 % Acetonitril in H_2O. Puffer B : 0,08 % TFA in Acetonitril.

5.7 Native chemische Ligation (NCL)

5.7.1 Anforderungen an die Peptide

Für die Anwendung der nativen chemischen Ligation müssen die Peptide folgende Bedingungen erfüllen:

- An den C-Termini der Peptide i muss ein Thioester vorhanden sein. (Mit Ausnahme des finalen C-Terminus')

Mit Hilfe dieses Thioesters kommt es durch eine Umesterung zur Thioesterbindung zwischen den beiden Peptiden, was schließlich die Bildung der neuen Peptidbindung ermöglicht.

- An den N-Termini der Peptide i+1 muss ein Cysteinrest vorhanden sein. Dieses Cystein muss für eine mehrstufige Ligation reversibel geschützt sein. Am N-Terminus des Ziel-Proteins muss kein Cystein vorhanden sein.

Bei dem in der ersten Ligation eingesetzten Peptid mit N-terminalem Cystein wird dieses Cystein nur mit einer Boc-Schutzgruppe eingeführt. In allen Fällen, in denen das Cystein geschützt sein musste, weil es erst in der nächsten Ligation reagieren sollte, wurde es als 1,3-Thiazolidin eingeführt. Das 1,3-Thiazolidin-Derivat ist inert gegenüber HF und den üblichen Synthese- und Ligationsbedingungen. Das 1,3-Thiazolidin kann später durch Einwirkung von Methoxyamin-Hydrochlorid (MAH) bei pH 4 in Cystein überführt werden. Die Entschützung ist in Abbildung 5-23 dargestellt.

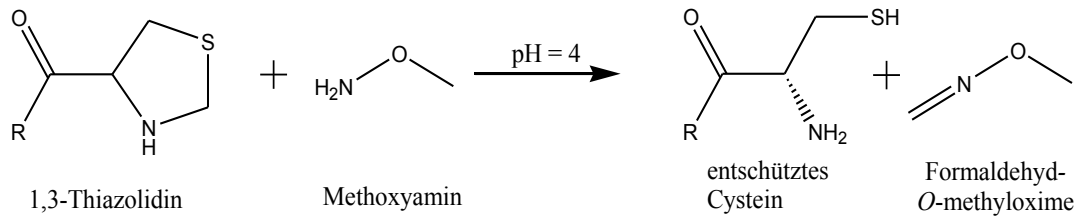


Abbildung 5-23: Entschützung des als 1,3-Thiazolidin-geschützten Cysteins

Bei der Umsetzung von 1,3-Thiazolidinen mit Methoxyamin kommt es zur Ringöffnung und zur Bildung des ungeschützten Cysteins

- Vicinal zu den C- und N-Termini dürfen keine an Cβ-verzweigten Aminosäurereste vorhanden sein, da sie eine deutliche Reduktion der Ligationsgeschwindigkeit verursachen.

- Der dem Thioester in der Sequenz vorangehende Aminosäurerest darf kein Aspartat oder Glutamat sein, da es sonst zur Bildung eines intramolekularen Säureanhydrids kommen kann, was zur Bildung zweier isomerer Ligationsprodukte führen würde.

Bei Asparaginsäure- oder Glutaminsäure-Thioestern kann es zur Bildung eines intramolekularen Säureanhydrids und somit zur Abspaltung des Thioesters kommen. Das reaktive Säureanhydrid kann dann mit dem terminalem Cystein des Ligationspartners reagieren. Dabei kommt es zur Bildung zweier isomerer Verbindungen, da das Cystein mit beiden Carbonsäurefunktionen reagiert. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 5-24 gezeigt.

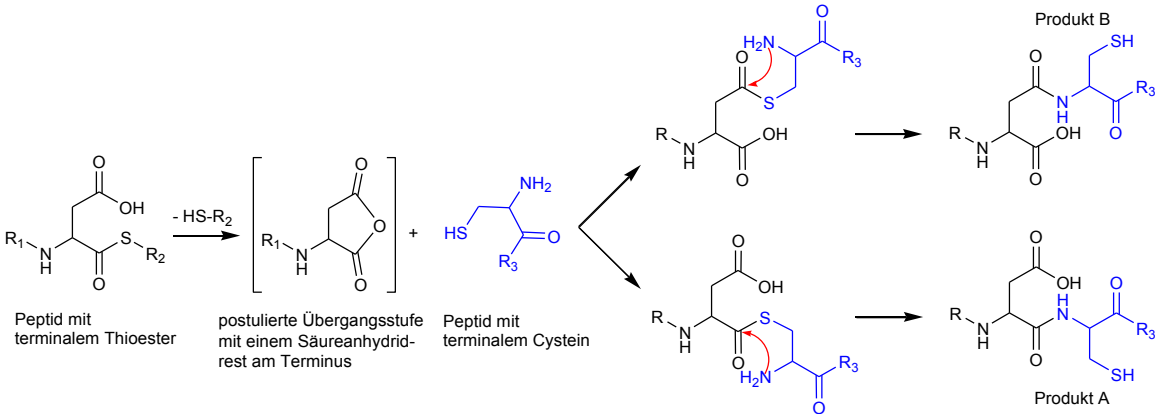


Abbildung 5-24: Reaktionsschema der Nebenreaktion von Asp- und Glu-Thioestern

Unter Abspaltung des Thioesters kann es zur Bildung eines Säureanhydrids kommen. Dieses reaktive Säureanhydrid kann nun mit dem Cystein des zu ligierenden Peptides reagieren. Bei dieser Reaktion kommt es zur Thioesterbindung zwischen dem Cystein und einer der beiden Carbonsäurefunktionen. Mit welcher Carbonsäurefunktion eine Bindung eingegangen wird ist höchstwahrscheinlich rein zufällig da keine der Rektionen sterisch oder energetisch bevorzugt sein sollte. Die beiden Zwischenprodukte bilden dann unter Bildung einer Peptidbindung die isomeren Produkte A und B

Der Nachweis dieser Nebenreaktion erfolgte experimentell mittels einer kleinen Testligation. Dazu wurde das Cystein-haltige Peptid CFRANL mit dem Asparaginsäure-Thioester KTWTDXA ligiert. Die Ligation war zwar erfolgreich, aber es ergaben sich zwei Produkte mit identischer Masse, aber unterschiedlichen Retentionszeiten (Abbildung 5-25).

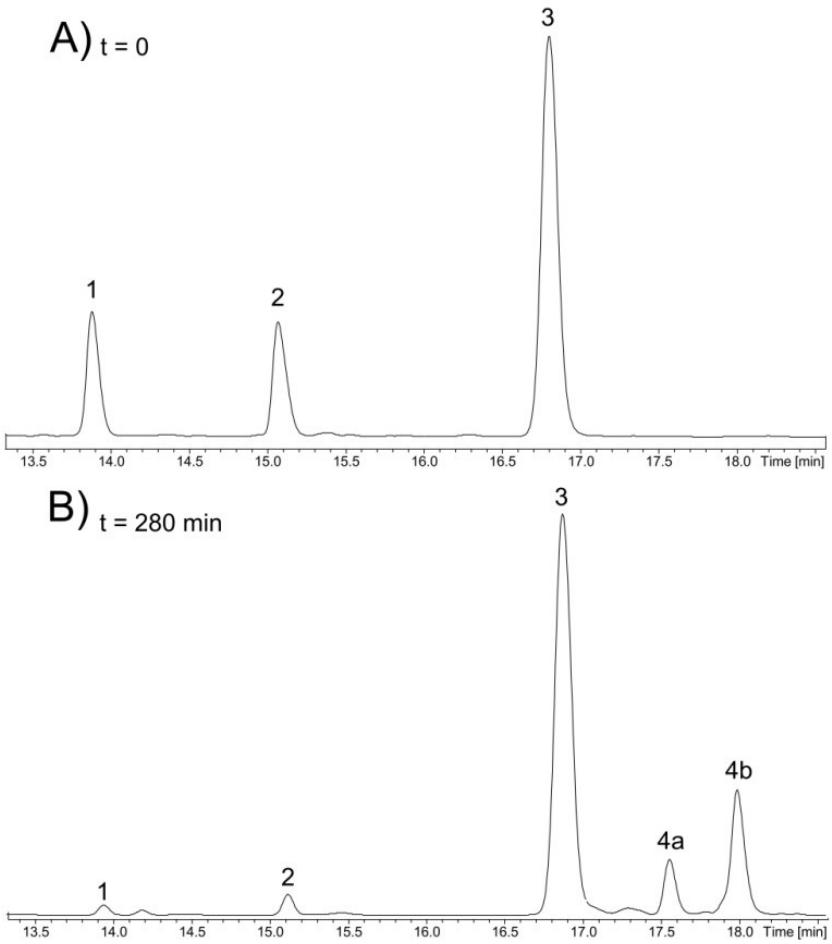


Abbildung 5-25: Analytische HPLC-MS einer Testligation der Peptide CFRANL und KTWTDXA

Das eingesetzte MPAA war zum Teil oxidiert und ist damit verantwortlich für den Peak zwischen 16,7 und 16,9 min. A) UV-Chromatogramm (211nm) bei t=0. Linearer Gradient von 5-65 % Puffer B in 15 min bei 40 °C. Puffer A : 0,1 % TFA in H_2O. Puffer B : 0,08 % TFA in Acetonitril. B) UV-Chromatogramm (211nm) bei t = 280 min. Linearer Gradient von 5-65 % Puffer B in 15 min bei 40 °C. Puffer A : 0,1 % TFA in H_2O. Puffer B : 0,08 % TFA in Acetonitril. 1 = KTWTDXA. 2 = CFRANL. 3 =MPAA. 4a und 4b = die zwei isomeren Formen des Ligationsproduktes KTWTDCFRANL

5.7.2 Mechanismus der NCL

Bei der Ligation reagiert ein mit MPAA aktivierter Thioester von Peptid i (das spätere N-terminale Ende des neu gebildeten Peptides) mit dem N-terminalen Cystein von Peptid i+1 (das spätere C-terminale Ende des neu gebildeten Peptides). Dabei kommt es als erstes zur Umesterung und somit zur Thioesterbindung zwischen den beiden Peptiden. Durch diese reversible Thioesterbindung kann die Aminofunktion des Cysteins in räumliche Nähe zum Kohlenstoff der Thiosäuregruppe des zweiten Peptides gelangen, gefolgt von einem nucleophilen Angriff auf die Aminofunktion diesen Kohlenstoffatoms. Dadurch kommt es zur Bildung eines stabilen ringförmigen Übergangszustandes. Die irreversible Spaltung der Bindung zwischen dem Schwefelatom und dem Kohlenstoffatom der ursprünglichen Säurefunktion bildet sich anschließend eine Peptidbindung zwischen den beiden Peptiden aus. Die Reaktionen sind in Abbildung 5-26 dargestellt.

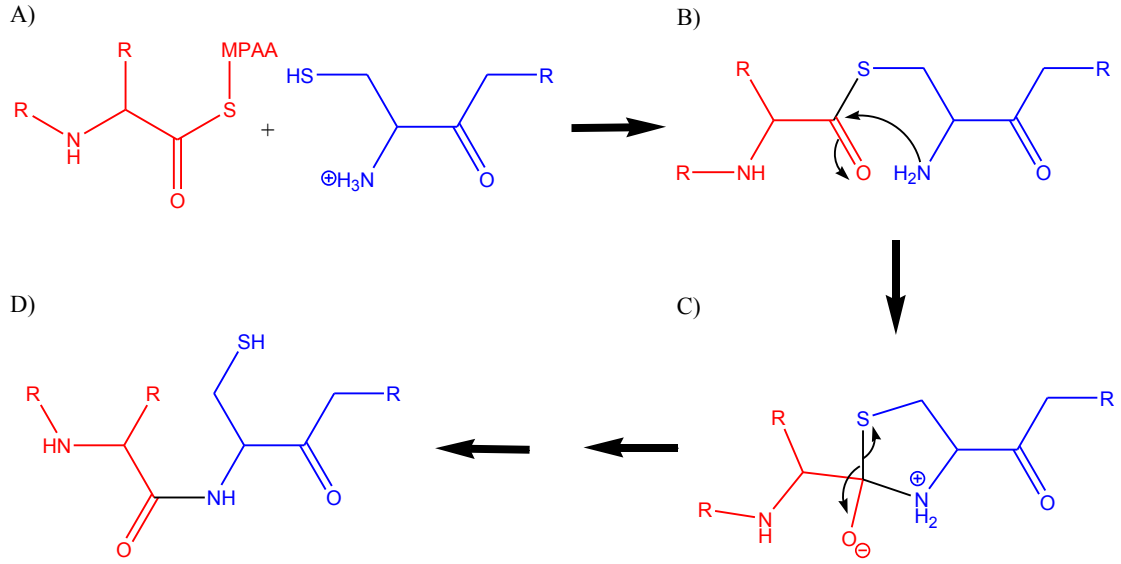


Abbildung 5-26: Ablauf der nativen chemischen Ligation (NCL)

A) Das Peptid i mit dem Thioester ist in rot dargestellt, das Peptid i+1 mit dem Cystein in blau. Der Thioester ist in diesem Fall durch MPAA aktiviert. Zwischen dem Thioester und dem Cystein kommt es nun zu einer Umesterung. Das MPAA wird abgespalten und es bildet sich eine Esterbindung zwischen den beiden Reaktionspartnern.

B) Bei dem Thioester-Zwischenprodukt greift der Stickstoff das Kohlenstoff-Atom der ursprünglichen Thiosäurefunktion nucleophil an. Dadurch bildet sich ein reaktiver ringförmiger Übergangszustand.

C) Durch Spaltung der Bindung zwischen dem Schwefel-Atom und dem Kohlenstoff-Atom der ursprünglichen Säurefunktion kommt es zur Bildung der Peptidbindung zwischen den beiden Reaktionspartnern.

D) Das Reaktionsprodukt der Ligation

5.7.3 Reaktionsbedingungen der NCL

Die Ligationen erfolgten im Ligationspuffer (6 M GdnHCl, 100 mM Na_2HPO_4, pH 7), der vor der Verwendung von im Puffer gelösten Sauerstoff durch Einleiten von Stickstoff befreit wurde.

Während der gesamten Ligation musste darauf geachtet werden, dass möglichst kein Sauerstoff in Kontakt mit der Reaktionslösung kommt. Der Sauerstoff reagiert mit den Cysteinen der Peptide zu (unerwünschten) Disulfidbrücken, die die Ligation stören. Zudem wird MPAA durch Sauerstoff oxidiert, somit ist dieses MPAA nicht mehr für die Aktivierung des Thioesters verfügbar. Außerdem stört oxidiertes MPAA die nachfolgende Chromatographie, da es eine ähnliche Retentionszeit hat, wie die gesuchten Peptide/Proteine.

Nachdem der Puffer entgast war, wurde in einem luftdicht verschließbaren Reaktionsgefäß aus Glas die für die Ligation benötigte Menge an MPAA und TCEP vorgelegt. Zu diesem Gemisch wurde nun etwa 50 % der benötigten Menge an Ligationspuffer zugefügt (1 ml). Dann wurde der pH-Wert der Lösung auf pH 7 eingestellt. Dabei wurde eine Lösung von 1 M NaOH mit 6 M GdnHCl verwendet. Durch die Verwendung dieser mit GdnHCl versetzten Natronlauge war es möglich, die GdnHCl Konzentration auf 6 M zu halten. Dies war wichtig, da es durch das Absenken der GdnHCl-Konzentration bei Verwendung reiner Natronlauge zu Löslichkeitsproblemen mit den Peptiden kommen konnte. Nachdem der pH-Wert eingestellt wurde, wurde die Lösung mit dem Ligationspuffer auf das endgültige Volumen aufgefüllt (2 ml). Dieser Puffer wurde für fünf Minuten mit Stickstoff gespült. Die zu ligierenden Peptide wurden in ein weiteres Reaktionsgefäß aus Glas überführt und mit der benötigten Menge an Ligationspuffer (mit MPAA und TCEP) versetzt.

Die Menge des verwendeten Puffers richtete sich nach der Menge der verwendeten Peptidmenge. Die maximal verwendete Peptidkonzentration bei den Ligationen war 20 mg/ml. Das kleinste praktikable Volumen betrug ca. 0,5 ml, da mit der vorhandenen pH-Elektrode kleinere Volumina nicht mehr gemessen werden konnten. Nachdem die Peptide gelöst und der Ligationsansatz erneut mit Stickstoff gespült wurde (1 min), wurde der Ansatz zuerst für zwei Stunden bei 37 °C und dann die restlichen 21 Stunden bei 20 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten (t=0, t=1,…, t=23) wurden kleine Proben entnommen und der Reaktionsverlauf mittels HPLC-MS verfolgt.

5.7.4 Entschützen des Cysteins (geschützt als THZ) im Ligationspuffer

Bei den Ligationsprodukten (abgesehen vom letzten Ligationsprodukt) musste nach der Ligation das geschützte terminale Cystein entschützt werden, damit es für die nächsten Ligationen einsetzbar wurde. In der Regel konnte das Cystein direkt im Ligationsansatz entschützt werden. Dazu wurde zum Ligationsansatz die benötigte Menge an MAH (Endkonzentration 300 mM, + 50 mM TCEP) zugefügt und der pH auf 4 eingestellt. Dazu wurde eine Lösung von 1 M HCl mit 6 M GdnHCl verwendet. Die Lösung wurde dann für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Erfolg der Entschützung wurde mittels HPLC-MS bestimmt. Es zeigte sich hierbei ein Massenverlust von 12 Da beim Produkt.

5.7.5 Entschützen des Cysteins (geschützt als THZ) direkt vor der Ligation

Das Produkt der Ligation zwischen den Peptiden 654 und 3 durfte – anders als in den anderen Fällen - nicht im Ligationsansatz der Ligation entschützt werden, da sich das entschützte Produkt (Peptid 6543) anschließend nur schlecht aufreingen ließ. Deshalb wurde Peptid 6543 zuerst aufgereinigt und erst unmittelbar vor der nächsten Ligation entschützt.

Dazu wurde zur Entschützung folgendes Protokoll verwendet:

- Lösen des zu entschützenden Peptides/Proteins im Puffer der folgenden Zusammensetzung: (6 M GdnHCl, 50 mM TCEP, 300 mM MAH, pH 4)
- Inkubation bei 37 °C für 2h
- Den pH auf 7 einstellen
- Diese Lösung mit einem doppelt konzentrierten Ligationspuffer (mit MPAA und TCEP) 1:1 mischen
- Das entsprechende Thioester-Peptid hinzufügen und wie gewohnt inkubieren.

Dieses Protokoll hat den Vorteil, dass man das Peptid nach dem Entschützen nicht reinigen muss, da das MAH nicht mit der Ligation interferiert.

5.8 Flüssigchromatographie

Der apparative Aufbau einer *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) ähnelt dem einer *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Beide Anlagen bestehen aus Pumpen zum Transport der mobilen Phasen, einer Probenaufgabe, einem Detektor und einer Trennsäule. Der einzige gravierende Unterschied liegt in den verwendeten Drücken. Die FPLC arbeitet bis zu 50 bar (GE ÄktaFPLC), eine typische HPLC mit bis zu 1200 bar (Agilent HP1290). Wegen der hohen Druckstabilität können deshalb bei der HPLC viel feiner granulierte und daher dichtere Säulenmaterialen verwendet werden, die eine deutlich bessere chromatographische Auflösung bieten als die bei der FPLC üblichen Säulenmaterialien.

Das Anwendungsgebiet der FPLC liegt daher eher im Bereich der Proteinreinigung, das einer HPLC eher in der Peptidreinigung. Nachfolgend wird der generelle Aufbau einer FPLC und einer HPLC beschrieben.

5.8.1 Aufbau einer FPLC-Anlage

In der Regel besteht eine FPLC-Anlage aus ein bis zwei Pumpen, einem Mixer für den Puffer, einem Proben-Injektor, einer Chromatographiesäule, einem Detektor mit angeschlossenem Computer oder Papierschreiber und ggf. einem Fraktionssammler. Gesteuert werden die heutigen Anlagen mit Hilfe eines Computers (Abbildung 5-27).

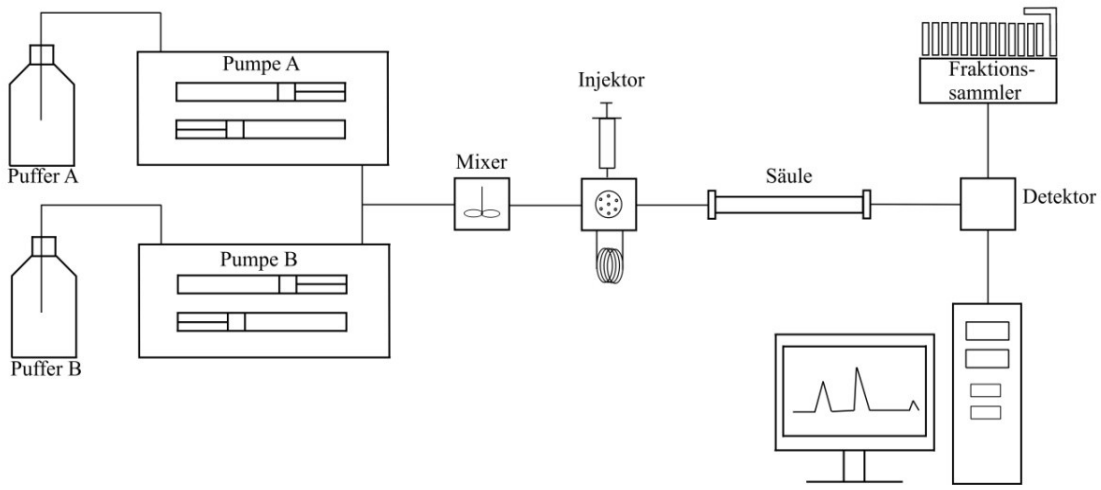


Abbildung 5-27: Schematischer Aufbau einer FPLC-Anlage

Bei Systemen mit zwei Pumpen wird das gewünschte Puffer-Mischungsverhältnis über die unterschiedliche Flussrate der beiden Pumpen, die jeweils einen anderen Puffer fördern, eingestellt. Bei Systemen mit nur einer Pumpe schaltet ein Ventil während des Betriebes zwischen den beiden Puffern hin und her und stellt so das gewünschte Mischungsverhältnis ein. Bei beiden Systemen folgt ein Mischer, der die beiden Puffer vollständig vermischt. Danach erreicht der Pufferstrom den Injektor. Mit Hilfe des Injektors wird die Probenschleife, in die vorher die Probe gefüllt wurde, zwischen Mischer und Chromatographiesäule geschaltet. Die Probe wird aus der Probenschleife in die Chromatographiesäule überführt. Hinter der Chromatographiesäule wird das Eluat UV-spektrometrisch gemessen, ggf. werden außerdem die Leitfähigkeit, Temperatur und pH erfasst. Die Messung der Temperatur dient im Allgemeinen nur dazu, die Messung der temperaturabhängigen Leitfähigkeit zu korrigieren. Die Daten des Detektors werden dann mit Hilfe eine Papierschreibers oder eines Computers aufgezeichnet. Als letzter Baustein folgt der Fraktionssammler, mit dem die Proben in Aliquots aufgefangen werden.

5.8.2 Aufbau einer HPLC-Anlage

In der Regel besteht eine HPLC-Anlage aus einem Entgaser, zwei Hochdruckpumpen, einem Mixer, einem Injektor mit angeschlossenem Autosampler, einem Säulenofen zum Temperieren der Chromatographiesäule, der Chromatographiesäule selbst, einem Detektor mit angeschlossenem Computer oder Papierschreiber und ggf. einem Fraktionssammler. Heutige Anlagen sind Computer-gesteuert (Abbildung 5-28).

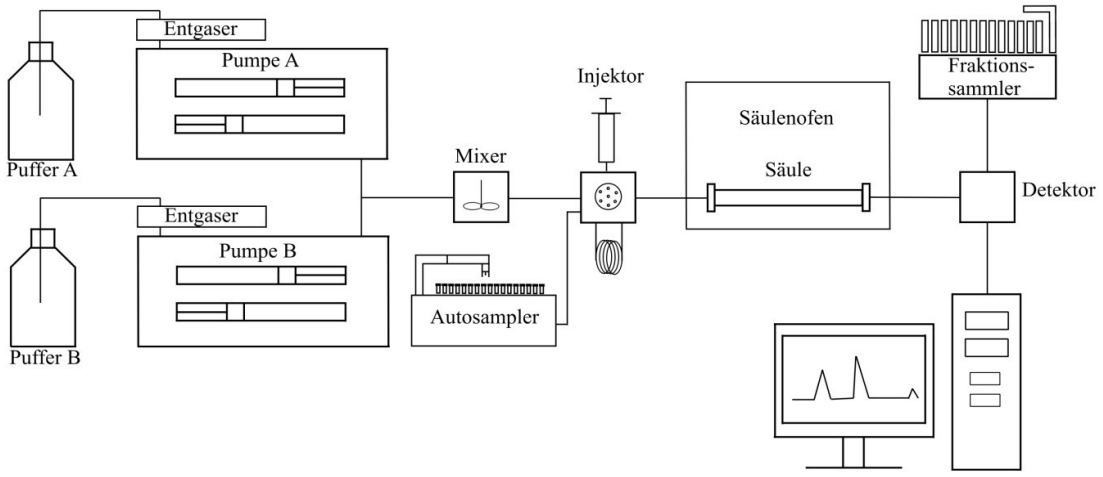


Abbildung 5-28: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage

Zwischen den Puffern und den Pumpen befindet sich der Entgaser, der die Puffer von gelösten Gasen, vor allem von Sauerstoff befreien soll. Bei großen präparativen Chromatographien und den dann deutlich höheren Flussraten wird auf den Entgaser verzichtet und stattdessen die Puffer während der Chromatographie ständig mit z.B. Helium gespült. Das Mischungsverhältnis der beiden Puffer wird über die Geschwindigkeit der beiden Pumpen geregelt. Im Anschluss an die Pumpen wird dann der Puffer mit Hilfe eines Mischers vollständig vermischt. Nach dem Mischer erreicht der Pufferstrom den Injektor. In der Regel wird die Probe mit Hilfe eines Autosamplers auf die Säule aufgetragen. Der Autosampler erlaubt auch das automatische Durchführen von Chromatographien, ohne dass der Anwender anwesend sein muss. Neben einem Auftrag über den Autosampler besteht aber auch die Möglichkeit, wenn ein entsprechendes Injektionsventil vorhanden ist, die Probe über einen Probenloop aufzutragen. Nach dem Injektor folgt nun die Chromatographiesäule, die sich in einem Säulenofen befindet. Da sich eine Erhöhung der Temperatur häufig positiv auf das Ergebnis der Chromatographie auswirkt, werden die Säulen im Säulenofen auf z.B. 40 °C erwärmt. Es folgt der Detektor. Gemessen wird hier üblicherweise nur die UV-Absorption bei Wellenlängen von 211, 254 oder 280 nm. Wird ein Diodenarray-Detektor verwendet, lassen sich zeitgleich auch mehrere Absorptionen bei verschiedenen Wellenlängen messen. Die Daten des Detektors werden dann mit Hilfe eine Papierschreibers oder eines Computers aufgezeichnet. Als letzter Baustein folgt nun der Fraktionssammler, mit dem die Proben in Fraktionen aufgefangen werden können.

5.9 Chromatographische Trennmethoden

5.9.1 Gelfiltration

Die Gelfiltration ist eine Größen-Ausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC), bei der die Probenmoleküle nach ihrer Größe getrennt werden. Das verwendete Säulenmaterial ist porös mit einer definierten Porengröße. Moleküle, die größer als diese Poren sind, wandern mit der Lösungsmittelfront und eluieren als erstes. Sind die Moleküle jedoch kleiner als die Porengröße, wandern sie durch die Partikel des Säulenmaterials hindurch, wodurch sich die zurückgelegte Wegstrecke im Vergleich zu den großen Molekülen deutlich vergrößert. Je kleiner die Moleküle sind, desto größer wird auch die Wegstrecke, die zurückgelegt wird. Auf diese Weise erfolgt die Trennung nach Größe. Zum Unterdrücken von ionischen Wechselwirkungen zwischen Probe und Säulenmaterial wird dem Gelfiltrationspuffer in der Regel NaCl in einer Konzentration von 50 bis 150 mM zugefügt.

5.9.2 Ni-NTA-Chromatographie

Die Ni-NTA-Chromatographie ist eine Metallchelat-Affinitätschromatographie mit deren Hilfe Proteine, die einen His-*Tag* besitzen, gereinigt werden können. Das Säulenmaterial dieser Ni-NTA-Säulen besitzt Nitrilotriessigsäure als Chelatligand. An diesen Liganden können dann prinzipiell verschiedene Metallionen wie Cu^{2+}, Fe^{3+} oder Ni^{2+} gebunden werden. In der Regel wird nur Ni^{2+} verwendet. Beim Binden des Metallions an das Säulenmaterial werden nicht alle Koordinationsplätze besetzt, sodass Histidinreste, die eine große Affinität für Metallionen besitzen, diese freien Koordinationsplätze besetzen können. Auf diese Weise werden Proteine mit einem His-*Tag* an die Säule gebunden, während die Verunreinigungen nicht binden und sofort eluieren. Das Protein mit dem His-*Tag* wird dann mit Hilfe eines Imidazol-haltigen Puffers von der Säule eluiert, indem das Imidazol die Histidinreste aus der Koordination des Chelatkomplexes verdrängt.

5.9.3 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustausch-Chromatographie ist die bei der Reinigung von Proteinen am häufigsten eingesetzte Chromatographie-Methode. Sie wird häufig als erster Schritt einer Reinigung durchgeführt. Dabei binden die Proteine aufgrund ionischer Wechselwirkungen mit dem positiv (Anionenaustauscher) oder negativ (Kationenausstauscher) geladenen Säulenmaterial.

Proteine besitzen auf Grund der sauren oder basischen Seitenketten der Aminosäurereste eine negative oder positive Gesamtladung. Diese Ladung ist pH-Wert abhängig, da die Seitenketten protoniert oder deprotoniert werden können. Bei einem für das Protein spezifischen pH-Wert, dem isoelektrischen Punkt (pI), ist das Protein neutral, da sich die positiven und negativen Ladungen neutralisieren. Bei einem pH = pI versagt mithin die Ionenaustauschchromatographie. Je weiter der pH vom pI abweicht, desto größer wird die Ladung der Proteine bzw. die Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial.

Bei pH < pI -1 (Protonierung der Aminofunktionen und tendenziell der Säurefunktionen) ist das Protein mithin positiv geladen und erfordert einen Kationenaustauscher zur Trennung. Andernfalls (pH > pI +1, tendenziell deprotonierte Säuregruppen) ist das Protein negativ geladen und erfordert zur Trennung einen Anionenaustauscher. Die Elution der Probe lässt sich entweder durch pH-Änderung oder steigende Salzkonzentration des Elutionspuffers erreichen. Dabei verdrängen die Salzionen die Proteine von den geladenen Bindungsstellen des Säulenmaterials.

5.9.4 Hydroxylapatit-Chromatographie

Der Mechanismus der Hydroxylapatit-Chromatographie ist nicht auf eine einzige Eigenschaft des Säulenmaterials ($Ca_5(PO_4)_3(OH)$) zurückzuführen. Diese Chromatographie wird häufig als pseudo-Affinitäts- oder *mixed mode*-Ionenchromatographie bezeichnet, da eine Reihe von verschiedenen Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Diese Wechselwirkungen sind im Einzelnen:

Anionenaustausch mittels Ca^{2+}

Metallaffinität mittels Ca^{2+}

Kationenaustausch mittels Phosphatgruppen

Wasserstoffbrückenbindungen mit den kristallinen Hydroxylgruppen

Die Elution der Proteinprobe erfolgt bei dieser Chromatographie z. B. mit einem phosphathaltigen Puffer, durch Änderung der Ca^{2+}-Konzentration oder durch einen KCl-Gradienten.

5.9.5 Umkehrphasen (*reversed phase*) Chromatographie

Bei der Reversed Phase Chromatographie wird ein Säulenmaterial verwendet, dessen Oberfläche mit aliphatischen Kohlenwasserstoffketten modifiziert worden ist. Je nach Kettenlänge spricht man dann von C4, C8 oder z.B. C18 Säulenmaterial. Die Zahl hinter dem C gibt die Länge der Kohlenwasserstoffkette an. Je länger die Ketten, desto unpolarer ist das Säulenmaterial und desto größer ist die Hydrophobizität.

Proben binden über hydrophobe Wechselwirkungen an die Matrix. Zu Beginn der Chromatographie verwendet man zur Verstärkung dieses Effektes ein polares Lösungsmittel als mobile Phase. Die mobile Phase wird dann durch die graduelle Steigerung der Konzentration des unpolaren Lösungsmittels immer apolarer, was schließlich zur Elution der Proteine führt. Üblicherweise wird hierbei das im Verhältnis zum Wasser apolare Acetonitril verwendet, daneben aber auch Methanol, iso-Propanol oder Tetrahydrofuran.

5.10 Massenspektrometrie

5.10.1 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI- MS)

Bei der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) wird die zu analysierende Probe über eine sehr feine Stahlkapillare in ein Massenspektrometer eingeleitet. Zwischen der Kapillare und dem Analysator ist ein starkes elektrisches Feld angelegt, was zur Polarisierung der Probenlösung und schließlich zur Bildung von kleinen geladenen Tropfen führt. Diese Tropfen verlieren auf dem Weg zum Analysator stetig Lösungsmittelmoleküle, wodurch die Tropfen immer kleiner werden. Da durch diesen Verlust an Lösungsmittel aber die Ladungsdichte immer größer wird, kommt es, wenn die Ladungsdichte zu groß wird, zur Coulomb-Explosion. Durch das Verdampfen des Lösungsmittels und durch die Coulomb-Explosionen werden die Tropfen immer kleiner, bis schließlich die zu analysierenden Moleküle geladen und vollständig vom Lösungsmittel befreit sind. Diese Moleküle erreichen nun den Massenanalysator und werden anhand ihres Masse/Ladung-Verhältnisses detektiert.

5.10.2 Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Bei der Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) wird eine schonende Ionisierungsmethode verwendet, die vor allem zur sonst nicht möglichen Analyse von thermisch sensiblen und von großen Molekülen verwendet wird.

Die zu analysierende Probe wird zusammen mit einer Matrix-Verbindung kokristalliert. Als Matrix-Verbindung dienen hauptsächlich aromatische Carbonsäuren wie z.B. 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder Sinapinsäure. Zur Kokristallisation wird eine Lösung der Matrix-Verbindung im 1.000 bis 100.000 fachem molarem Überschuss zur Probelösung gegeben, auf einen Probenteller pipettiert und getrocknet. Beim Verdunsten des Lösungsmittels erfolgt die Kristallisation. Nachdem die Probe vollständig getrocknet ist, kann sie in das MALDI-MS eingeschleust werden. Die Ionisierung erfolgt durch den Beschuss der Matrix/Proben-Kristalle mittels kurzwelligen Lasers. Dabei wird die Matrix-Verbindung verdampft und die Probenmoleküle ionisiert und in die Gasphase freigesetzt. Die Ionen werden dann in einem elektrischen Feld beschleunigt und mit Hilfe eines Flugzeitmassenspektrometers analysiert.

6 Literatur

1. **Campbell, N.A. & Reece**, **J.B**. *Biologie*, 6. Auflage, Pearson Studium-Verlag, München. (**2006**).

2. **MITCHELL, P.** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-8 (**1961**).

3. **Krieger, E., Koraimann, G. & Vriend, G.** Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA-a self-parameterizing force field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **47**, 393-402 (**2002**).

4. **Weber, J. & Senior, A.E.** ATP synthesis driven by proton transport in F_1F_0-ATP synthase. *FEBS Letters* **545**, 61-70 (**2003**).

5. **Junge, W., Sielaff, H. & Engelbrecht, S**. Torque generation and elastic power transmission in the rotary F_OF_1-ATPase. *Nature* **459**, 364-370 (**2009**).

6. **Pänke, O., Gumbiowski, K., Junge, W. & Engelbrecht, S**. F-ATPase: specific observation of the rotating c subunit oligomer of EF_oEF_1. *FEBS Letters* **472**, 34-8 (**2000**).

7. **Angevine, C.M., Herold, K.A.G., Vincent, O.D. & Fillingame, R.H.** Aqueous Access Pathways in ATP Synthase Subunit a: reactivity of cysteine substituted into transmembrane helices 1, 3, and 5. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 9001-9007 (**2007**).

8. **Di Zhang & Vik, S.B.** Helix packing in subunit a of the *Escherichia coli* ATP synthase as determined by chemical labeling and proteolysis of the cysteine-substituted protein. *Biochemistry* **42**, 331-7 (**2003**).

9. **Langemeyer, L. & Engelbrecht, S**. Essential arginine in subunit a and aspartate in subunit c of F_oF_1 ATP synthase. Effect of repositioning within Helix 4 of subunit a and Helix 2 of subunit c. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1767**, 998-1005 (**2007**).

10. **Boyer, P.D**. The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochimica et biophysica acta* **1140**, 215-50 (**1993**).

11. **Itoh, H. *et al***. Mechanically driven ATP synthesis by F_1-ATPase. *Nature* **427**, 465-8 (**2004**).

12. **Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. & Kinosita, K**. Direct observation of the rotation of F_1-ATPase. *Nature* **386**, 299-302 (**1997**).

13. **Cingolani, G. & Duncan, T.M.** Structure of the ATP synthase catalytic complex (F_1) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation. *Nature structural & molecular biology* **18**, 701-707 (**2011**).

14. **Milton, R.C., Milton, S.C. & Kent, S.B**. Total chemical synthesis of a D-enzyme: the enantiomers of HIV-1 protease show reciprocal chiral substrate specificity [corrected]. *Science (New York, N.Y.)* **256**, 1445-8 (**1992**).

15. **Vigneaud, V., Ressler, C. & Swan, C**. The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *Journal of the American Chemical Society* **75**, 4879-4880 (**1953**).

16. **Merrifield, R.** Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **85**, 2149-2154 (**1963**).

17. **Schnölzer, M., Alewood, P., Jones, A., Alewood, D. & Kent, S.B.H**. In Situ Neutralization in Boc-chemistry Solid Phase Peptide Synthesis. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **13**, 31-44 (**2007**).

18. **Wieland, T., Lang, H. & Liebsch, D.** Über Peptidsynthesen. 11. Mitteilung Intramolekulare Aminoacylwanderung bei Peptiden. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **597**, 227-234 (**1955**).

19. **Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I. & Kent, S.B.** Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science (New York, N.Y.)* **266**, 776-9 (**1994**).

20. **Harpaz, Z., Siman, P. & Brik, A**. Protein Synthesis Assisted by Native Chemical Ligation at Leucine. *Chembiochem* **11**, 1232-5 (**2010**).

21. **Botti, P., Carrasco, M. & Kent, S**. Native chemical ligation using removable N [alpha]-(1-phenyl-2-mercaptoethyl) auxiliaries. *Tetrahedron Letters* **42**, 1831-1833 (**2001**).

22. **Bang, D. & Kent, S.B.** A one-pot total synthesis of crambin. *Angewandte Chemie International Edition* **43**, 2534-8 (**2004**).

23. **Le Canne, Ferredamare, S., Burley, S. & Kent, S**. Total chemical synthesis of a unique transcription factor-related protein: cMyc-Max. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 2998-3007 (**1995**).

24. **Bang, D., Pentelute, B.L. & Kent, S.B**. Kinetically controlled ligation for the convergent chemical synthesis of proteins. *Angewandte Chemie International Edition* **45**, 3985-8 (**2006**).

25. **Baca, M., Muir, T. & Schnoelzer, M**. Chemical ligation of cysteine-containing peptides: synthesis of a 22 kDa tethered dimer of HIV-1 protease. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 1881-1887 (**1995**).

26. **Johnson, E.C., Malito, E., Shen, Y., Rich, D., Tang, W. & Kent, S.B**. Modular total chemical synthesis of a human immunodeficiency virus type 1 protease. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 11480-90 (**2007**).

27. **Durek, T., Torbeev, V.Y. & Kent, S.B.H**. Convergent chemical synthesis and high-resolution x-ray structure of human lysozyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 4846-4851 (**2007**).

28. **Kumar, K.S.A., Bavikar, S.N., Spasser, L., Moyal, T., Ohayon, S. & Brik, A**. Total Chemical Synthesis of a 304 Amino Acid K48-Linked Tetraubiquitin Protein. *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 6137-6141 (**2011**).

29. **Kochendoerfer, G.G.** Design and Chemical Synthesis of a Homogeneous Polymer-Modified Erythropoiesis Protein. *Science* **299**, 884-887 (**2012**).

30. **Sato, T., Saito, Y. & Aimoto, S**. Synthesis of theC-terminal region of opioid receptor like 1 in an SDS micelle by the native chemical ligation: effect of thiol additive and SDS concentration on ligation efficiency. *Journal of Peptide Science* **11**, 410-416 (**2005**).

31. **Johnson, E.C.B. & Kent, S.B.H**. Towards the total chemical synthesis of integral membrane proteins: a general method for the synthesis of hydrophobic peptide-αthioester building blocks. *Tetrahedron Letters* **48**, 1795-1799 (**2007**).

32. **Kato, A., Maki, K., Ebina, T., Kuwajima, K., Soda, K. & Kuroda, Y**. Mutational analysis of protein solubility enhancement using short peptide tags. *Biopolymers* **85**, 12-18 (**2007**).

33. **Schnölzer, M. & Kent, S.B**. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease. *Science (New York, N.Y.)* **256**, 221-5 (**1992**).

34. **Müller, M.** Das molekulare Drehlager der ATP-Synthase. *Doktorarbeit-Universität Osnabrück* (**2004**).

35. **Wise, J.G**. Site-directed mutagenesis of the conserved beta subunit tyrosine 331 of *Escherichia coli* ATP synthase yields catalytically active enzymes. *The Journal of biological chemistry* **265**, 10403-9 (**1990**).

36. **Smith, J.B. & Sternweis, P.C**. Purification of membrane attachment and inhibitory subunits of the proton translocating adenosine triphosphatase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **16**, 306-11 (**1977**).

37. **Vogel, G., Schairer, H.U. & Steinhart, R.** Complementation in vitro of mutant and wild-type ATPase of *Escherichia coli* using isolated subunits. *European journal of biochemistry / FEBS* **87**, 155-60 (**1978**).

38. **Bruni, A., Frigeri, L. & Bigon, E**. Cold lability of membrane-bound F1-ATPase. *Biochimica et biophysica acta* **462**, 323-32 (**1977**).

39. **Dunn, S.D. & Futai, M**. Reconstitution of a functional coupling factor from the isolated subunits of *Escherichia coli* F_1 ATPase. *The Journal of biological chemistry* **255**, 113-8 (**1980**).

40. **Wächter, A**. Funtionelle Konsequenzen von Deletionen in der γ-Untereinheit der ATP-Synthase aus *Eschericia coli*. *Diplomarbeit, Uni Osnabrück* (**2005**).

41. **Raussens, V., Ruysschaert, J. & Goormaghtigh, E**. Protein concentration is not an absolute prerequisite for the determination of secondary structure from circular dichroism spectra: a new scaling method. *Analytical Biochemistry* **319**, 114-121 (**2003**).

42. **Bracher, A., Starling-Windhof, A., Hartl, F.U. & Hayer-Hartl, M**. Crystal structure of a chaperone-bound assembly intermediate of form I Rubisco. *Nature structural & molecular biology* **18**, 875-80 (**2011**).

43. **Cox, G.B. *et al.*** Assembly of the adenosine triphosphatase complex in *Escherichia coli*: assembly of F_0 is dependent on the formation of specific F_1 subunits. *Journal of bacteriology* **148**, 30-42 (**1981**).

44. **Angov, E., Ng, T.C. & Brusilow, W.S.** Effect of the delta subunit on assembly and proton permeability of the F_0 proton channel of *Escherichia coli* F_1F_0 ATPase. *Journal of bacteriology* **173**, 407-11 (**1991**).

45. **Brusilow, W.S.** Assembly of the Escherichia coli F_1F_0 ATPase, a large multimeric membrane-bound enzyme. *Molecular microbiology* **9**, 419-24 (**1993**).

46. **Price, C.E. & Driessen, A.J.M.** Biogenesis of membrane bound respiratory complexes in Escherichia coli. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1803**, 748-766 (**2010**).

47. **Dalbey, R.E., Wang, 1.P., Kuhn, A. & Wang, P**. Assembly of Bacterial Inner Membrane Proteins. *Annual Review of Biochemistry* **80**, 161-187 (**2011**).

48. **Rak, M., Gokova, S., Alex, Tzagoloff, E. & Tzagoloff, A**. Modular assembly of yeast mitochondrial ATP synthase. *The EMBO Journal* **30**, 920-930 (**2011**).

49. **Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H.** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 2172-5 (**1989**).

50. **Sedmak, J.J. & Grossberg, S.E**. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry* **79**, 544-52 (**1977**).

51. **LeBel, D., Poirier, G.G. & Beaudoin, A.R.** A convenient method for the ATPase assay. *Analytical Biochemistry* **85**, 86-9 (**1978**).

52. **Laemmli, U.K**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (**1970**).

53. **Winkler, S.** Viskoelastische Eigenschaften von F-Aktin und die rotierende ATP-Synthase. *Diplomarbeit Uni Osnabrück* (**2001**).

54. **Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D. & Cook, P.I**. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry* **34**, 595-8 (**1970**).

7 Anhang

7.1 Material : Reagenzien, Lösungen, Medien und Geräte

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wie z.B. Salze, Puffersubstanzen und Lösungsmittel wurden von den handelsüblichen Anbietern (Roth, (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Steinheim)) in p.A.-Qualität bezogen.

7.1.1 Reagenzien für die Peptidsynthese, Ligation und Produktreinigung mittels HPLC

(Bestellnummern in Klammern)

2-Propanol, HPLC-Grade, (A1592,2500)	Applichem (Darmstadt)
4-Mercaptophenylessigsäure, (MPAA, 653152)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Acetonitril, Ultra Gradient Grade, (9017)	J.T. Baker (Kiel)
Ala-Pam-Harz, (RP00102)	Polypeptide (Strasbourg, Frankreich)
Ala-Pam-Linker, (LP00102)	Polypeptide (Strasbourg, Frankreich)
Boc-L-thiazolidin-4-carbonsäure, (THZ,A-3945)	Bachem (Bubendorf, Schweiz)
Dichlormethan, (P089.1)	Roth (Karlsruhe)
Diethylether, (T900.1)	Roth (Karlsruhe)
Dimethylformamid, (A529.2)	Roth (Karlsruhe)
HBTU[a], (RL-1030)	Iris-Biotech (Marktredwitz)
Methanol, HPLC Gradient-Grade, (8402)	J.T. Baker (Kiel)
Methoxyamin hydrochlorid, (MAH, 226904)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

[a]2-(1H-benzotriazol-1-yL)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat

N,N'-Diisopropylcarbodiimid, (DIC, D125407)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
N-Ethyldiisopropylamin, (DIEA, 03440)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
p-Cresol p.a., (61030)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
S-Trityl-3-mercaptopropionsäure, (3-MPA(Trt), RL-8605)	Iris-Biotech (Marktredwitz)
Trifluoressigsäure, (P088.2)	Roth (Karlsruhe)
Triisopropylsilan, (TIPS, 233781)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid, (TCEP, C4706)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Val-Pam-Harz, (RP02002)	Polypeptide (Strasbourg, Frankreich)
Val-Pam-Linker, (LP02002)	Polypeptide (Strasbourg, Frankreich)

7.1.2 Aminosäurederivate

Alanin: Boc-Ala-OH	Merck (Darmstadt)
Arginin: Boc-Arg(Tos)-OH	Merck (Darmstadt)
Asparagin: Boc-Asn(Xan)-OH	Merck (Darmstadt)
Aspartat: Boc-Asp(OcHx)	Merck (Darmstadt)
Cystein: Boc-Cys(Acm)-OH	Merck (Darmstadt)
Cystein: Boc-Cys(Trt)-OH	Merck (Darmstadt)
Cystein: Boc-L-thiazolidin-4-carbonsäure	Bachem (Bubendorf, Schweiz)
Glutamin: Boc-Gln-OH	Merck (Darmstadt)
Glutamat: Boc-Glu(OcHx)-OH	Merck (Darmstadt)
Glycin: Boc-Gly-OH	Merck (Darmstadt)
Histidin: Boc-His(3-Bom)-OH	Bachem (Bubendorf, Schweiz)

Isoleucin: Boc-Ile-OH	Merck (Darmstadt)
Leucin: Boc-Leu-OH	Merck (Darmstadt)
Lysin: Boc-Lys(2-Cl-Z)-OH	Merck (Darmstadt)
Methionin: Boc-Met-OH	Merck (Darmstadt)
Phenylalanin: Boc-Phe-OH	Merck (Darmstadt)
Prolin: Boc-Pro-OH	Merck (Darmstadt)
Serin: Boc-Ser(Bzl)-OH	Merck (Darmstadt)
Threonin: Bock-Thr(Bzl)-OH	Merck (Darmstadt)
Tryptophan: Boc-Trp-OH	Merck (Darmstadt)
Tryptophan: Boc-Trp(CHO)	Peptides International (Louisville, KY, USA)
Tyrosin: Boc-Tyr(2,6-di-Cl-Bzl)-OH	Merck (Darmstadt)
Valin: Boc-Val-OH	Merck (Darmstadt)

7.1.3 Weitere Reagenzien

4-Aminobenzamidin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
ATP	Roche Diagnostics (Mannheim)
Biotin-PEAC$_5$-Maleimid	Dojindo Laboratories (Kumamoto, JP)
Coomassie Brilliant Blau G 250	Serva Eletrophoresis GmbH (Heidelberg)
EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets	Roche Diagnostics (Mannheim)
EGTA	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethidiumbromid	Applichem (Darmstadt)

Glucose Oxidase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Guanidin HCl	Applichem (Darmstadt)
Harnstoff	Roth (Karlsruhe)
Imidazol	Serva Eletrophoresis GmbH (Heidelberg)
Katalase	Fluka (Buchs, CH)
L-Asparagin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
L-Isoleucin	Biomol (Hamburg)
L-Valin	Biomol (Hamburg)
Ni-NTA-Meerrettichperoxidase-Konjugat	Qiagen (Hilden)
Streptavidin	ICN Biomedicals (Aurora, Ohio, USA)
Tetracyclin	Roth (Karlsruhe)
Thiamin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Thymin	Sigma-Aldrich (Steinheim)

7.1.4 Kits und Verbrauchsmaterialien

FastDigest Restriktionsendonukleasen	Fermentas (Thermo Fisher Scientific)
Gelfiltrationssäulen NAP5, NAP10, PD10	GE Healthcare (München)
Lumi-Light^{Plus} Western Blot Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
Mutations-Primer	Thermo Fisher Scientific GmbH (Ulm)
PVDF-Membran	Roth (Karlsruhe)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)

7.1.5 Lösungen

Blot-Blockpuffer	50 mM Tris/HCl; 0,9 % (w/v) NaCl; 5% (w/v) Milchpulver (pH 7,4)
Blot-Transferpuffer	10 mM $NaHCO_3$; 3 mM Na_2CO_3; 20% (v/v) Methanol (pH 9,9)
Blot-Waschpuffer	50 mM Tris/HCl; 0,9% (w/v)NaCl; 0,05 % (v/v) Tween (pH 7,4)
BMKM-Puffer	20 mM MOPS/KOH; 50 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$; 10 mg/ml BSA (pH 7)
Coomassie Fixierer	10% (v/v) Eisessig; 40 % (v/v) EtOH; 50 % (v/v) H_2O
Coomassie Stocklösung 1	100 mg (w/v) Brilliant Blau R in 90% EtOH
Coomassie Stocklösung 2	20% (v/v) Eisessig
Dissoziationspuffer	50 mM MES/NaOH; 5 mM ATP; 0,5 mM EDTA; 800 mM LiCl (pH 6,0)
EF_1-Anionenaustauschpuffer A	50 mM Tris/HCl; 10% (v/v) MeOH (pH 7,4)
EF_1-Anionenaustauschpuffer B	50 mM Tris/HCl; 10% (v/v) MeOH; 500 mM Na_2SO_4 (pH 7,4)
EF_1-Präp.-Puffer 1	100 mM TES/NaOH; 40 mM 6-Aminocapronsäure; 20 mM MgAc; 6 mM 4-Aminobenzamidin Dihydrochlorid; 0,25 mM EGTA; 5% (v/v) Glycerin (pH 7)
EF_1-Präp.-Puffer 2	50 mM TES/NaOH; 40 mM 6-Aminocapronsäure; 6 mM 4-Aminobenzamidin Dihydrochlorid; 5% (v/v) Glycerin (pH 7)

EF_1-Präp.-Puffer 3	5 mM TES/NaOH; 40 mM 6-Aminocapronsäure; 6 mM 4-Aminobenzamidin Dihydrochlorid; 1 mM EDTA; 0,5 mM DTT 5% (v/v) Glycerin (pH 7)
EF_1-Präp.-Puffer 4	5 mM TES/NaOH; 40 mM 6-Aminocapronsäure; 1 mM EDTA; 0,5 mM DTT 5% (v/v) Glycerin (pH 7)
Einschlusskörperpuffer 1	20 Tris/HCl; 200 NaCl; 1% (w/v) SDS; 2 mM EDTA; 1 mM DTT (pH 8)
Einschlusskörperpuffer 2	10 Tris/HCl; 1% (w/v) SDS; 1 mM EDTA; 1 mM DTT (pH 8)
Elektrodenpuffer 5X	15 g Tris/HCl; 122 g Glycin; 50ml einer 10% SDS-Lsg. Mit H_20 auf 1 Liter aufgefüllt
Gelfiltrationspuffer	50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl (pH 7,4)
Guanidinpuffer	20 mM Tris/HCl; 6 M Guanidin HCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT (pH 7)
HPLC-Puffer A	0,1% (v/v)TFA in 20% (v/v) Acetonitril in H_2O
HPLC-Puffer B	0,08% (v/v)TFA in Acetonitril
Hydroxylapatit-Chromatografie Puffer A	50 mM Tris/HCl; 0,1 mM EDTA: 0,1 mM DTT (pH 8,0)
Hydroxylapatit-Chromatografie Puffer B	50 mM Tris/HCl; 0,1 mM EDTA: 0,1 mM DTT; 50 mM K_2HPO_4 (pH 8,0)
LeBel Lösung A	4,6% (w/v) NaAc/HAc; 0,25% $CuSO_4$ (pH 4)
LeBel Lösung B	5% (w/v) Ammoniumheptamolybdat ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$)
LeBel Lösung C	2% (w/v) 4-Methyl-Aminophenolhemisulfat; 5% $NaSO_4$

MKM-Puffer	20 mM MOPS/KOH; 50 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$ (pH 7)
Ninhydrin -Test: Lösung B	40g Phenol gelöst in 10 ml Ethanol
Ninhydrin -Test: Lösung C	2,5g Ninhydrin gelöst in 50 ml Ethanol
Ninhydrin-Test: Lösung A	1ml 0,01 mM $KCN_{(aq)}$ + 49 ml Pyridin
Ni-NTA Elutionspuffer	20 mM Tris/HCl; 50 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$; 10% (v/v) Glycerin; 150 mM Imidazol (pH 7,5)
Ni-NTA Waschpuffer	20 mM Tris/HCl; 50 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$; 10% (v/v)Glycerin; 20 mM Imidazol (pH 7,5)
Rekonstitutionspuffer	50 mM MES/NaOH; 10% Glycerin; 0,1 mM DTT; 2 mM $MgCl_2$; 2 mM ATP (pH 6)
S+G-Reagenz	600 mg Coomassie Blue G-250 in 1000 ml 3% (v/v) Perchlorsäure
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
TBE-Puffer (10X)	1 M Tris/Borsäure; 0,9 M Borsäure; 10mM EDTA (pH 8,3)
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
γ-Kationenaustauschpuffer A	20 mM MES/NaOH; 8M Harnstoff; 1 mM EDTA; 0,1 mM DTT (pH 6)
γ-Kationenaustauschpuffer B	20 mM MES/NaOH; 8M Harnstoff; 1 mM EDTA; 0,1 mM DTT; 1 M NaCl (pH 6)

7.1.6 Medien

LB-Medium	5 g Hefeextrakt; 10g Trypton; 10 g NaCl in einem Liter H_2O, pH 7,2
Mangelmedium	34 mM KH_2PO_4; 64 mM K_2HPO_4; 20 mM $(NH_4)_2SO_4$; 1 µM $FeSO_4$; 1µM $ZnCl_2$; 10 µM $CaCl_2$; 0,3mM $MgSO_4$; 2 µg Thiamin; 50µg Isoleucin; 50 µg Valin; 50 µg Thymin; 50 µg Asparagin; 0,5% (v/v) Glycerin
Succinat-Medium	34 mM KH_2PO_4; 64 mM K_2HPO_4; 20 mM $(NH_4)_2SO_4$; 1 µM $FeSO_4$; 1µM $ZnCl_2$; 10 µM $CaCl_2$; 0,3mM $MgSO_4$; 2 µg Thiamin; 50µg Isoleucin; 50 µg Valin; 50 µg Thymin; 50 µg Asparagin; 0,4% (v/v) Natriumsuccinat
TSS-Medium	0,8 g Trypton; 0,5 g Hefe-Extrakt; 0,5 g NaCl; 20 g PEG 8000; 10 ml DMSO; 10ml einer 1M MgSO4-Lsg.; auf 100 ml auffüllen, pH 6,5

7.1.7 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese Mini sub GT	Bio Rad (München)
ÄktaFPLC	GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)
Äktaprime plus	GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)
Autoklav SystecV150	Systec (Wettenberg)
Brutschränke:	
Innova 4300	New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA)
Innova 44	New Brunswick Scientific(Edison, NJ, USA)
CD-Spektrometer J-810	JASCO (Groß-Umstadt)
Durchflusselektrode 16-900	Microelectrodes, Inc, (NH, USA)

Fraktionssammler Frac-100	Pharmacia (Freiburg)
French Press, Model FA-078	Thermo Electron Corporation (Dreieich)
French-Press-Zelle, Modell Fa-032 (35ml Volumen)	Thermo Electron Corporation(Dreieich)
Gefriertrocknungsanlage ALPHA 1-2 LD plus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode)
Hand-Homogenisator 60 ml (Potter)	Sartorius (Göttingen)
HF-Abspaltungsapparatur Typ1	Toho Kasei Co. Ltd. (Japan)
HPLC HP 1100 Bestehend aus: Degasser G1322A, Bin pump G1312A, ALS G1313A, Col comp G1316A, DAD G1315A	Hewlett-Packard (Böblingen)
Konduktometer Typ 600	Knick (Dülmen)
Laborrührer IKA-RW 15	IKA (Staufen)
Laborschüttler Polymax 1040	Heidolph (Schwabach)
MALDI-Massenspektrometer Ultraflex TOF/TOF	Bruker Daltonics GmbH (Bremen)
Massenspektrometer amaZon speed ETD und HCT	Bruker Daltonics GmbH (Bremen)
Membranpumpe Vacuubrand Membranpumpe MZ2C	Vacuubrand (Wertheim)
Mini-Vertikal-Gel-Elektrophorese	Roth (Karlsruhe)
Nanodrop-1000 Spektrophotometer	Peqlab (Erlangen)
Papierschreiber REC112	GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)
pH-Elektrode InLab Micro	Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
pH-Messgerät Knick Typ 743	Knick (Dülmen)
Photometer, Genesys 10-S	Thermo Spectronic (Dreieich)

Spannungsquelle für Elektrophorese Consort EV231	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschallbad Soronex RK 510 H	Jürgens Bandelin (Berlin)
Ultraschall-Desintegrator Sonifier 250	Branson (Dietzenbach)
Vakuumfiltrationsgerät, GV 050/s	Whatman (jetzt GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK))
Waagen:	
TE124S	Sartorius(Göttingen)
1216 MP	Sartorius(Göttingen)
Wasserbad bestehend aus: Kältebad K12 und Kontrolleinheit CC1	Huber (Offenburg)
Zentrifugen:	
Avanti J-26 XP	Beckman Coulter (Krefeld)
Eppendorf 5417	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge Max-130K	Beckman Coulter (Krefeld)
Ultrazentrifuge L7-65	Beckman Coulter (Krefeld)

7.1.8 Chromatographiesäulen

DEAE-Säule	Merk Superformance 26/50 (2,6x50 mm) gefüllt mit Tosoh Fractogel TSK-DEAE 650(S)
Gelfiltrations-Säule	Pharmacia HiLoad XK 16/60 (1,6x600 mm) gefüllt mit Superdex 200
HPLC-Säulen	Grace Vydac C4, (214TP), 300Å, 5 µm 2,1*50 mm, (214TP5205) 4,6*250 mm, (214TP54) 10*250 mm, (214TP510)
Hydroxylapatit-Säule	Pharmacia XK 26/20 (2,6x20 mm) befüllt mit Biorad HTP Gel

Kationenaustauscher-Säule	GE HiTrap SP, 5 ml
Ni-NTA-Säule	Merk Superformance 26/50 (2,6x50 mm) gefüllt mit 5 ml Qiagen, Ni-NTA-Superflow
Ni-NTA-Säule	GE HisTrap FF, 1 und 5 ml

7.1.9 Software

- Maldi-Software
  FlexAnalysis Version 3.3 (Build80), Bruker Daltonics GmbH.

- HPLC-Software
  ChemStation Rev. A.09.03 [1417], Agilent Technologies 1990-2002.

- HPLC-MS-Software
  DataAnalysis Version 4.0 SP 5 [Build 283], Bruker Daltonics GmbH 1993-2011.

- FPLC-Software
  Unicorn 5.11 [Build 407], General Electric Company 2006.
  PriemView 5.0 (Based on Unicorn 5.01 [Build 318]) Amersham Bioscience 2004.

- Programm für 3D Molekül-Simulationen und -Modellieren
  YASARA Version 12.4.1, Elmar Krieger 1993-2012

7.2 Abkürzungen

(v/v)	Volumenanteil
(w/v)	Gewichtsanteil
µg	Mikrogramm
2,6-di-Cl-Bzl	*2,6-Dichlorobenzyl*
2-Cl-Z	2-Chlorbenzyloxycarbonyl
Acm	Acetamidomethyl
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
Bom	Benzyloxymethyl
BSA	Rinderserumalbumin
Bzl	Benzyl
CD	Circulardichroismus
CHO	Formaldehyd
C-Quelle	Kohlenstoff-Quelle
DCM	Dichlormethan
ddH_20	Doppelt destilliertes H_20
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAse	Desoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF_1	Hydrophiler, katalytisch aktiver Teilkomplex (ATP-Hydrolyse) der ATPase von *E. coli*
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminomethyl)-tetraessigsäure
ESI	Elektrosprayionisation
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
GdnHCl	Guanidiniumhydrochlorid
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yL)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton

LB-Medium	Medium nach Luria-Bertani
M	Konzentration in Mol pro Liter
MAH	Methoxyamin-Hydrochlorid
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions / Ionisations-Massenspektrometrie
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mg	Milligramm
MPAA	4-Mercaptophenylessigsäure
MW	Molmasse
NCL	Native chemische Ligation
OcHx	Cyclohexylester
OD_{600}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pam	Phenalacetamidomethyl
pI	Isoelektrischer Punkt
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THZ	1,3-Thiazolidin
TIPS	Triisopropylsilan
TMSOTf	Trimethylsilyl-trifluormethansulfonsäure
Tos	4-Toluolsulfonyl
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Trt	Trityl
Xan	Xanthenyl
z	Ladung

Bei der Synthese verwendete Schutzgruppen:

2,6-di-Cl-Bzl	*2,6-Dichlorobenzyl*
2-Cl-Z	2-Chlorbenzyloxycarbonyl
Acm	Acetamidomethyl
Boc	*tert*-Butoxycarbonyl
Bom	Benzyloxymethyl
Bzl	Benzyl
CHO	Formaldehyd
OcHx	Cyclohexylester
Tos	4-Toluolsulfonyl
Trt	Trityl
Xan	Xanthenyl

Ein- und Dreibuchstabencode der 20 codierenden Aminosäuren

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

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Struktur von Adenosintriphosphat (ATP) 1
Abbildung 1-2 : ATP als universeller Energieüberträger 2
Abbildung 1-3 : Strukturmodell der F_OF_1-ATPase aus *E. coli* 4
Abbildung 1-4 : Der Transport der Protonen über die Untereinheiten a und c 6
Abbildung 1-5 : Modelle der L- und D-γ-Untereinheit 9
Abbildung 1-6 : Hypothet.Unterschiede in der Rotationsrichtung von L-γ und D-γ bei der Hydrolyse von ATP. .. 10
Abbildung 1-7 : Flussdiagram einer Festphasensynthese 13
Abbildung 1-8 : Temporäre Schutzgruppen 14
Abbildung 1-9 : Abspaltung-Mechanismen der Schutzgruppen Boc und Fmoc. 15
Abbildung 1-10: Native chemische Ligation 19
Abbildung 1-11 : Aminosäurederivate für Ligationen ohne Cystein 20
Abbildung 1-12 : Verwendung einer temporären Hilfsgruppe bei einer Ligation ohne Cystein 20
Abbildung 1-13 : Sequenzielle Ligation 21
Abbildung 1-14 : Konvergente Ligation 22
Abbildung 1-15 : Zweistufige kinetisch kontrollierte Ligation 22
Abbildung 3-1: Analytische HPLC-Läufe der Peptid 1-Synthese 29
Abbildung 3-2: Maßstabsgetreue Darstellung der Syntheseausbeuten bei Peptidsynthesen 30
Abbildung 3-3: Analytische HPLC-MS mit den sechs Rohpeptiden 32
Abbildung 3-4: Analytische HPLC-MS mit den gereinigten Peptiden 33
Abbildung 3-5: Flussschema der konsekutiven Ligation 35
Abbildung 3-6: Zeitlicher Verlauf von Ligation 1 37
Abbildung 3-7: HPLC-MS des Ligationsproduktes von Ligation 1 37
Abbildung 3-8: Zeitlicher Verlauf von Ligation 2 38
Abbildung 3-9: HPLC-MS des Ligationsproduktes von Ligation 2 39
Abbildung 3-10: Zeitlicher Verlauf von Ligation 3 40
Abbildung 3-11: HPLC-MS des Ligationsproduktes von Ligation 3 40
Abbildung 3-12: Zeitlicher Verlauf von Ligation 4 42
Abbildung 3-13: HPLC-MS des Ligationsproduktes von Ligation 4 42
Abbildung 3-14: Mögliche Reaktionsgleichung der Nebenreaktion zwischen einem Peptid und MAH ... 43
Abbildung 3-15: Zeitlicher Verlauf von Ligation 5 45
Abbildung 3-16: MALDI-MS-Analyse des Ligationsproduktes von Ligation 5 45
Abbildung 3-17: Verunreinigung einer Probe durch PEG 48
Abbildung 3-18: Flussdiagram der EF_1-Präparation 53
Abbildung 3-19: Anionen-Austauschchromatographie mit dem EDTA-Rohextrakt 54
Abbildung 3-20: Ni-NTA-Chromatographie von DEAE-EF_1 55

Abbildung 3-21: SDS-PAGE mit gereinigten EF_1-Proben 56
Abbildung 3-22: Ablauf der Dissoziations-Experimente 57
Abbildung 3-23: SDS-PAGE mit Fraktionen einer Ni-NTA-Chromatographie des gealterten EF_1-Präzipitats 58
Abbildung 3-24: SDS-PAGE mit Fraktionen der Ni-NTA-Chromatographien der gelfiltr. und dialys. Probe 59
Abbildung 3-25: Ni-NTA Chromatographie mit dissoziiertem EF_1 60
Abbildung 3-26: Hydroxylapatit-Chromatographie mit dissoziiertem EF_1 nach Ni-NTA Chromatographie 61
Abbildung 3-27: SDS-PAGE mit den gereinigten Untereinheiten 62
Abbildung 3-28: Immundekoration der präparierten Untereinheiten 63
Abbildung 3-29: Kationenaustausch-Chromatographie mit überproduziertem γ 64
Abbildung 3-30: SDS-PAGE von Fraktionen aus der γ-Aufreinigung 64
Abbildung 3-31: Analytische HPLC-MS mit gereinigtem γ 65
Abbildung 3-32: CD-Spektrum der renaturierten γ-Untereinheit 66
Abbildung 3-33: Durchführung der Rekonstitutions-Gelfiltration 68
Abbildung 3-34: Gelfiltrationen von Rekonstitutionsansätzen mit und ohne γ 69
Abbildung 3-35: SDS-PAGE mit rekonstituiertem EF_1 71
Abbildung 3-36: HPLC-Lauf der Reinigung des 5. Ligationsansatzes (Ligationsprodukt 23456 + Peptid 1) 72
Abbildung 3-37: MALDI-MS von Fraktionen (Pools 2, 3 und 4) der Chrom. des letzten Ligationsansatzes 73
Abbildung 3-38: Ergebnisse der Gelfiltration von Rekonstitutionen mit den Pools 2, 3 und 4 74
Abbildung 3-39: SDS-PAGE mit rekonstituiertem Rumpf-EF_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma_{synth}$) 75
Abbildung 3-40: SDS-PAGE mit Rekonstitutionsansätzen mit und ohne γ 76
Abbildung 3-41: Fällung von α, β und γ unter Rekonstitutionsbedingungen 77
Abbildung 3-42 : Röntgenkristallographisches Modell von EF_1 82
Abbildung 3-43 : Röntgenkristallographisches Modell der γ-Untereinheit 83
Abbildung 5-1: Plasmidkarte des pKH7-Vektors 89
Abbildung 5-2: Plasmidkarte des pALTER®-1-Vektors 90
Abbildung 5-3: Überblick über die einzelnen Schritte der Klonierung des 5-Cys-γ 92
Abbildung 5-4: Flussdiagram der EF_1-Präparation 98
Abbildung 5-5: SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese mit Proben aus der γ-Reinigung 99
Abbildung 5-6: Abhängigkeit des errechneten α-Helix-Anteils von der Proteinkonzentration 103
Abbildung 5-7: Schematische Darstellung des fluoreszenzmikroskopischen Rotationstests 107
Abbildung 5-8: Aufbau der Durchflussküvette 107
Abbildung 5-9: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte des Rotationstests 108
Abbildung 5-10: Reaktionsgleichungen des Sauerstoff verbrauchenden Systems 110
Abbildung 5-11: Volumenzunahme beim Quellen des Aminomethylharzes 111
Abbildung 5-12: Kopplung des PAM-Linkers an das Aminomethylharz 112
Abbildung 5-13: Die Thioestersynthese ausgehend vom Boc-AS-PAM-Harz 113
Abbildung 5-14: Flussdiagram der Peptidsynthese 114
Abbildung 5-15: Volumenzuwachs während der Synthese am Beispiel des Peptides 6 115

Abbildung 5-16: Reaktion des Ninhydrins in Anwesenheit von freien Aminofunktionen. 116
Abbildung 5-17: Negativer und positiver Ninhydrin-Test 116
Abbildung 5-18: Analytische HPLC-MS-Chromatographie des Syntheseproduktes von Peptid 5 119
Abbildung 5-19: Analytischer HPLC-Lauf mit Peptid 5 Rohprodukt 120
Abbildung 5-20: Präparativer HPLC-Lauf mit Peptid 5 Rohprodukt 121
Abbildung 5-21: Fraktionen des präparativen HPLC-Laufes mit Peptid 5 Rohprodukt 122
Abbildung 5-22: Analytische HPLC-Läufe mit den vereinigten Fraktionen und dem Rohprodukt..... 123
Abbildung 5-23: Entschützung des als 1,3-Thiazolidin-geschützten Cysteins 124
Abbildung 5-24: Reaktionsschema der Nebenreaktion von Asp- und Glu-Thioestern 125
Abbildung 5-25: Analytische HPLC-MS einer Testligation der Peptide CFRANL und KTWTDXA 126
Abbildung 5-26: Ablauf der nativen chemischen Ligation (NCL)..... 127
Abbildung 5-27: Schematischer Aufbau einer FPLC-Anlage 130
Abbildung 5-28: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage 131

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 : Permanente Schutzgruppen 16
Tabelle 1.2 : Produktausbeuten in Abhängigkeit von Kopplungseffizienz und Kopplungszahl 17
Tabelle 3.1: zu synthetisierende Peptide und ihre Sequenzen 25
Tabelle 3.2: Unterschiede der Syntheseprotokolle 27
Tabelle 3.3: Ideale Produktmengen von 0,4 Millimol-Synthesen 28
Tabelle 3.4: Ausbeuten der Rohpetidreinigung 29
Tabelle 3.5: MPAA und TCEP Konzentration in den Ligationsansätzen 34
Tabelle 3.6: Ligation 1: Peptidmengen und Ausbeute 36
Tabelle 3.7: Ligation 2: Peptidmengen und Ausbeute 38
Tabelle 3.8: Ligation 3: Peptidmengen und Ausbeute 39
Tabelle 3.9: Ligation 4: Peptidmengen und Ausbeute 41
Tabelle 3.10: Ligation 5: Peptidmengen und Ausbeute 44
Tabelle 3.11 : Abweichungen in der Aminosäuresequenz des γ_{synth} vom γ_{nat} 46
Tabelle 3.12: Sequenzen und Massen identifizierter Produkte bei der Synthese von Peptid 6 47
Tabelle 3.13: Gemessene und errechnete Sekundärstrukturanteile 66
Tabelle 3.14 : Gemessene ATPase-Aktivität der Rekonstitutionen mit nativem γ 70
Tabelle 3.15: Ergebnisse der Proteinbestimmung der Pools 2, 3 und 4. 73
Tabelle 3.16 : Gemessene ATPase-Aktivität der Rekonstitutionen mit synthetischem γ..... 75
Tabelle 3.17: Massenanteile einzelner Untereinheiten bei Rekonstitutionsansätzen 77

Tabelle 5.1: Liste der verwendeten Primer 90
Tabelle 5.2: Pipettierschema für eine analytische Restriktion 93
Tabelle 5.3: Pipettierschema für eine präparative Restriktion mit gleichzeitiger Dephosphorylierung..... 94
Tabelle 5.4: Pipettierschema der Proteinbestimmung nach Sedmak und Grossberg 100
Tabelle 5.5: Pipettierschema zur Bestimmung der ATP-Hydrolyseaktivität nach LeBel..... 101
Tabelle 5.6: Pipettierschema für die Herstellung der Testlösung für den LeBel-Test 101
Tabelle 5.7: Pipettierschema für die Herstellung des Sammel- und des Trenngels für die SDS-PAGE.. 104
Tabelle 5.8: Pipettierschema für den fluoreszenzmikroskopischen Rotationstest 109

7.5 Danksagung

Danken möchte ich

- apl. Prof. Dr. Siegfried Engelbrecht-Vandré für die umfassende und intensive Betreuung während meiner Doktorarbeit.
- Prof. Dr. Martin Engelhard für die Übernahme des Zweitgutachtens und der unschätzbaren Unterstützung bei der Peptidsynthese.
- Dr. Gabriele Deckers-Hebestreit und Prof. Dr. Wolfgang Junge für die Bereitschaft, als Prüfer meiner Promotionsprüfer beizusitzen.
- Prof. Dr. Wolfgang Junge und Prof. Dr. Christian Ungermann für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes.
- Allen Mitgliedern des MPI Dortmund, die mir bei der Synthese geholfen haben, vor allem Marc Dittmann für die Hilfe bei Fragen der Synthese und bei der HF-Abspaltung und Dr. Ralf Seidel für die Synthese der ersten Thioester-Harze.
- Prof. Dr. Stephen Kent für die unschätzbare Unterstützung und für die Möglichkeit, während eines 14-wöchigen Aufenthalts in Chicago die Peptidsynthese und die Peptidligation in seinem Labor zu erlernen.
- Den Mitgliedern und den Besuchern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephen Kent im Sommer 2010 (Fangkun Deng, Ariel Furst, Wilson Ho, Ryo Okamoto, Sam Pollock, Michal Avital Shmilovici, Duhee Bang), aber vor allem Dr. Kalyaneswar Mandel für die umfassende Betreuung während meines Aufenthalts in Chicago.
- Den technischen Angestellten Gaby Hikade und Hella Kenneweg der „ehemaligen“ Biophysik und Katrin Auffahrt und Angela Perz der Biochemie für die Hilfe und Unterstützung bei allen Fragen des Laboralltages.
- Dem EMBO für die Unterstützung meines Forschungsaufenthaltes in Chicago mit einem großzügigem short term fellowship (ASTF 225-2009).
- Dem „harten Kern“ der Volleyballer des Univolleyballs für die nötige Ablenkung zwischendurch.

- Meiner Mutter für die vielfältige Unterstützung während dieser Arbeit.

7.6 Lebenslauf

Frank Wintermann

Persönliche Daten

Geburtsdatum	03.10.1979
Geburtsort	Oldenburg (Oldb)

Bildungsgang

Schule

07/86 – 06/99	Grundschule Ofen Orientierungsstufe Bad Zwischenahn Realschule Bad Zwischenahn Gymnasium Bad Zwischenahn

Wehrdienst

07/99 – 04/00	PzGrenBtl. 323, Schwanewede

Studium

10/00 – 09/06	Chemiestudium an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
	Anfertigung der Diplomarbeit in der Abteilung Mikrobiologie am „Institut für die Chemie und Biologie des Meeres‘‘ (ICBM) der Universität Oldenburg Thema der Diplomarbeit: “Screening mariner Bakterien-gemeinschaften auf die Produktion oberflächenaktiver Substanzen.”
11/07 – 02/12	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Osnabrück

7.7 Publikationsliste

Wintermann F, Engelbrecht S. Reconstitution of the *Escherichia coli* F-ATPase $(\alpha\beta)_3\gamma$ catalytic core using chemically synthesized subunit γ. *Angewandte Chemie International Edition* (**in Druck**)

DOI: 10.1002/anie.201206744 und 10.1002/ange.201206744.

Wächter A, Bi Y, Dunn SD, Cain BD, Sielaff H, Wintermann F, Engelbrecht S, Junge W. Two rotary motors in F-ATP synthase are elastically coupled by a flexible rotor and a stiff stator stalk. Proc Natl Acad Sci U S A. Mar 8;108 (10):3924-9. (**2011)**

7.8 Eidesstattliche Erklärung

Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlichen materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

....

(Ort. Datum) (Unterschrift)

8 Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 ATP 1

1.2 Die F_OF_1-ATPase aus Escherichia coli 4

1.3 ATP-Synthese 6

1.4 Einfluss der Form der γ-Untereinheit auf die katalyt. Zentren 8

1.5 Proteine 11

1.6 Peptidsynthesen 12

1.7 Peptidligation 17

2 Zielsetzung 24

3 Ergebnisse und Diskussion 25

3.1 Synthese der γ-Untereinheit 25

3.1.1 Synthese der Peptide 25

3.1.2 Ligation der Peptide 34

3.1.3 Probleme bei der Peptidsynthese und Ligation 46

3.1.4 Diskussion (Peptidsynthesen und Ligationen) 49

3.2 Präparationen der nativen Untereinheiten 53

3.2.1 Präparation der EF_1-ATPase 53

3.2.2 Dissoziation von EF_1 56

3.2.3 Präparation der Untereinheiten α und β 60

3.2.4 Präparation von Untereinheit γ 63

3.2.5 Diskussion 67

3.3 Rekonstitution von Rumpf-EF_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma$) 68

3.3.1 Rekonstitution mit nativem γ 68

3.3.2 Rekonstitution mit totalsynthetischem γ 72

3.3.3 Fällung der Untereinheiten bei der Rekonstitution 76

3.3.4 Diskussion 79

4 Zusammenfassung 84

5 Methoden 87

5.1 Stämme, Plasmide und Primer 87

5.1.1 Stämme 87

5.1.2 Plasmide 88

5.1.3 Primer ... 90

5.2 Molekularbiologische Methoden ... 91

5.2.1 Klonierung des 5-Cys-γ ... 91

5.2.2 Isolierung von Plasmiden ... 93

5.2.3 Analytische und präparative Restriktionen ... 93

5.2.4 Ligation von Plasmidfragmenten ... 94

5.2.5 Transformation von *E. coli* -Zellen ... 95

5.2.6 Herstellung kompetenter Zellen ... 95

5.2.7 Agarose Gelelektrophorese ... 96

5.3 Mikrobiologische Arbeitsmethoden ... 96

5.3.1 Zellanzucht ... 96

5.3.2 Wachstumstests auf Succinat ... 97

5.4 Biochemische Arbeitsmethoden ... 98

5.4.1 Präparation von EF_1 ... 98

5.4.2 γ- Überexpression und Reinigung ... 99

5.4.3 Proteinbestimmung ... 100

5.4.4 Bestimmung der ATPase-Aktivität ... 100

5.4.5 CD-Spektroskopie ... 102

5.4.6 SDS-Gelelektrophorese ... 104

5.4.7 Immunotransfer (Western Blot) ... 105

5.4.8 Biotinylierung von EF_1 ... 106

5.4.9 Fluoreszenzmikroskopischer Rotationstest ... 107

5.5 Peptidsynthese ... 111

5.5.1 ... 111

5.5.2 Pam-Linker Synthese ... 111

5.5.3 Thioestersynthese ... 112

5.5.4 Peptidsynthese ... 114

5.5.5 Ninhydrin-Test ... 116

5.5.6 HF-Abspaltung ... 117

5.6 Peptidpräparation ... 117

5.6.1 Lösen der lyophilisierten Rohpeptide ... 117

5.6.2 Probenauftrag ... 118

5.6.3 Peptidreinigung am Beispiel des Peptides 5 ... 118

5.7 Native chemische Ligation (NCL) ... 124

5.7.1 Anforderungen an die Peptide ... 124

5.7.2 Mechanismus der NCL ... 127

5.7.3 Reaktionsbedingungen der NCL ... 128
5.7.4 Entschützen des Cysteins (geschützt als THZ) im Ligationspuffer ... 129
5.7.5 Entschützen des Cysteins (geschützt als THZ) direkt vor der Ligation ... 129

5.8 Flüssigchromatographie ... 130
5.8.1 Aufbau einer FPLC-Anlage ... 130
5.8.2 Aufbau einer HPLC-Anlage ... 131

5.9 Chromatographische Trennmethoden ... 132
5.9.1 Gelfiltration ... 132
5.9.2 Ni-NTA-Chromatographie ... 133
5.9.3 Ionenaustauschchromatographie ... 133
5.9.4 Hydroxylapatit-Chromatographie ... 134
5.9.5 Umkehrphasen (*reversed phase*) Chromatographie ... 134

5.10 Massenspektrometrie ... 135
5.10.1 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI- MS) ... 135
5.10.2 Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS). 135

6 Literatur ... 136

7 Anhang ... 142
7.1 Material : Reagenzien, Lösungen, Medien und Geräte ... 142
7.1.1 Reagenzien für die Peptidsynthese, Ligation und Produktreinigung mittels HPLC ... 142
7.1.2 Aminosäurederivate ... 143
7.1.3 Weitere Reagenzien ... 144
7.1.4 Kits und Verbrauchsmaterialien ... 145
7.1.5 Lösungen ... 146
7.1.6 Medien ... 149
7.1.7 Geräte ... 149
7.1.8 Chromatographiesäulen ... 151
7.1.9 Software ... 152

7.2 Abkürzungen ... 153
7.3 Abbildungsverzeichnis ... 156
7.4 Tabellenverzeichnis ... 158
7.5 Danksagung ... 160
7.6 Lebenslauf ... 161
7.7 Publikationsliste ... 162
7.8 Eidesstattliche Erklärung ... 163