

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biotechnologie

**Selektive Modifikation nukleotidbindender Proteine:
Protein-DNA-Konjugate zur Untersuchung von
Ypt-Bindungspartnern und Semisynthese der
Thymidinmonophosphatkinase**

Lars Gogolin

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Groll

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Chr. F. W. Becker
2. Univ.-Prof. Dr. F. E. Kühn

Die Dissertation wurde am 30.08.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und wurde durch die Fakultät für Chemie am 21.09.2010 angenommen.

Für meine Eltern

*„Nichts beflügelt die Wissenschaft so, wie der Schwatz mit
Kollegen auf dem Flur“*

Arno Penzias (*1933), amerik. Physiker, 1978 Nobelpreis

1. Einleitung	1
1.1 Synthese von Protein-DNA-Konjugaten zur Herstellung eines Protein-Mikroarrays	1
1.2 Semisynthese der Thymidinmonophosphat-Kinase	10
2. Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien	15
2.2 Instrumentation.....	15
2.3 Lösungen und Puffer für molekularbiologisches Arbeiten	17
2.4 Lösungen und Puffer für Proteinchemisches Arbeiten	18
2.5 Bakterienstämme und Oligonukleotide.....	20
2.6 HPLC-Puffer	21
2.7 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.7.1 Zellanzucht.....	21
2.7.2 UV-photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	22
2.7.3 Agarosegelelektrophorese zur DNA-Auftrennung.....	22
2.7.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	22
2.7.5 Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab.....	22
2.7.6 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab.....	23
2.7.7 Amplifikation von DNA-Fragmenten	23
2.7.8 Restriktion von DNA	23
2.7.9 Ligation von DNA.....	24
2.7.10 Elektrotransformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen	24
2.7.11 Sequenzierung von DNA	25
2.8 Proteinchemische Methoden	25
2.8.1 Expression und Reinigung der Ypt-Proteine.....	25
2.8.2 Generierung des C-terminalen α -Thioesters der Ypt-Proteine.....	26
2.8.3 <i>Southernblot</i> zum Nachweis von Protein-DNA-Konjugaten	26
2.8.4 Expression der menschlichen TMPK.....	27
2.8.5 Tev-Verdau des DNAK(1-18)His ₆ -(ENLYFQ)-TMPK31-212-Konstruktes.....	27
2.8.6 Rückfaltung der TMPK1-212.....	28
2.8.7 Cy5-Markierung von DSS4.....	28
2.8.8 Reinigung der Protein-DNA-Konjugate.....	28
2.8.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	29
2.8.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Proteinauftrennung ...	29
2.8.11 Silberfärbung.....	30

2.9 Biophysikalische Methoden	30
2.9.1 Analytik der Oligonukleotide.....	30
2.9.2 CD-Spektroskopie	30
2.9.3 Gekoppelter, UV-spektroskopischer Enzymtest zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{cat} der TMPK.....	31
2.9.4 Fluoreszenz-basierte Mikroarray-Experimente.....	31
2.9.4.1 Hybridisierung von Protein-DNA-Konjugaten	31
2.9.4.2 Nukleotidaustausch an den immobilisierten Ypt-Proteinen.....	31
2.9.4.3 GTP-ATTO-Verdrängung an Ypt1 Δ 2C-Oligonukleotid-A durch DSS4-Bindung.....	32
2.9.4.4 Cy5-DSS4-Bindung an Ypt1 Δ 2C-Oligonukleotid-A.....	32
2.9.5 MALDI-TOF-Analyse eines Ypt-Bindungspartners.....	32
2.10 Chemische Methoden.....	33
2.10.1 Synthese von N-Fmoc-L-Cystein(S- <i>t</i> -Butylthio)-O-NHS	33
2.10.2 Kopplung des N-Fmoc-L-Cystein(S- <i>t</i> -Butylthio)-O-NHS an das Oligonukleotid.....	33
2.10.3 Native chemische Ligation der Ypt-Proteine mit dem Peptid H-CGK _(NBD) GHHHHHH-OH.....	34
2.10.4 Native chemische Ligation der Ypt-Proteine mit den Cystein-modifizierten Oligonukleotiden.....	34
2.10.5 Festphasensynthese von Peptiden	35
3. Ergebnisse	37
3.1 Strategie zur Immobilisierung der Ypt-Familie auf einer festen Oberfläche.....	37
3.2 Synthese und Aufreinigung der Cystein-modifizierten Oligonukleotide.....	40
3.2.1 Aktivierung des N-Fmoc-L-Cystein(S- <i>t</i> -Butylthio)-OH.....	40
3.2.2 Cystein-Modifizierung der Oligonukleotide	41
3.2.3 Expression und Reinigung der Ypt-Proteine.....	43
3.2.4 Expression und Aufreinigung von Cherry-Ypt7 Δ 3.....	46
3.3 Native chemische Ligation der Ypt-Proteine.....	48
3.3.1 Testligation des Ypt1 Δ 2C-SR mit dem Peptid H-CGK _(NBD) GHHHHHH-OH	48
3.3.2 Optimierung der Ligation der Ypt-Proteine mit den Cys-Oligonukleotiden am Beispiel von Ypt1 Δ 2C und Cys-Oligonukleotid-A.....	50
3.3.3 Analyse von Protein-DNA-Konjugaten durch einen <i>Southernblot</i>	52
3.3.4 Native chemische Ligation des Cherry-Ypt7 Δ 3 mit Cys-Oligonukleotid-D	53

3.3.5	Reinigung der Protein-DNA-Konjugate durch Größenausschluss-Chromatographie.....	55
3.3.6	Reinigung von Cherry-Ypt7 Δ 3-Oligonukleotid-D durch Größenausschluss-Chromatographie.....	56
3.4	Mikroarray-Experimente der Ypt-DNA-Konjugate.....	57
3.4.1	Detektion des Cherry-Ypt7 durch Auslesen direkter Fluoreszenz.....	57
3.4.2	Aktivierung der immobilisierten Ypt-Protein durch einen GDP-GTP-Austausch..	60
3.5	Bindungseigenschaften und Funktion der immobilisierten Ypt-Proteine.....	62
3.5.1	Verdrängung des Nukleotids aus der Bindungstasche durch Bindung eines GEF	62
3.5.2	Bindung von Cy5-markiertem DSS4 an immobilisiertes Ypt1.....	63
3.5.3	Selektivität der Bindung von DSS4 an immobilisiertem Ypt1.....	64
3.6	Detektion der Bindung von DSS4 an Ypt1 auf dem Mikroarray durch MALDI-MS....	65
3.7	Strategie und Syntheschema zur Semisynthese der Tymidylat-Monophosphat-Kinase.....	67
3.8	Expression und Reinigung der TMPK31-212.....	69
3.8.1	Expression der TMPK.....	69
3.8.2	Reinigung des exprimierten Fusionskonstruktes.....	70
3.8.3	Tev-Verdau des gereinigten Fusionkonstruktes.....	72
3.9	Synthese der TMPK1-30.....	74
3.10	Synthese der Biotin-Tev-TMPK1-30.....	76
3.11	Native chemische Ligation der TMPK1-30 mit der TMPK31-212.....	78
3.12	Native chemische Ligation der Biotin-TMPK1-30 und TMPK31-212.....	79
3.13	Reinigung der TMPK1-212.....	80
3.14	Expression und Reinigung der Wildtyp-TMPK1-212.....	85
3.15	Analyse des Reinheitsgrades der wtTMPK und der semisynthetisch hergestellten TMPK.....	86
3.16	Aktivitätsassay der wtTMPK.....	87
3.17	Rückfaltung der semisynthetischen TMPK1-212.....	89
4.	Diskussion.....	91
4.1	Synthese, Charakterisierung und Reinigung der Protein-DNA-Konjugate.....	91
4.2	Immobilisierung der Protein-DNA-Konjugate.....	98
4.3	Expression, Peptidfestphasensynthese und Ligation der TMPK.....	105
5.	Zusammenfassung.....	111
6.	Literatur.....	115

Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	3'Azido-3'desoxythymidin
AZTDP	AZT-Diphosphat
AZTMP	AZT-Monophosphat
AZTTP	AZT-Triphosphat
bp	Basenpaar
CBD	Chitin Bindungs-Domäne
CHCA	α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure
DDI	DNA directed immobilization
DEAE	Diethylaminoethyl
DIEA	N,N-Diisopropylethylamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
EPL	expressed protein ligation
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	electron spray ionization mass spectrometry
EtBr	Ethidiumbromid
GAP	GTPase-activating protein
GDF	GDI displacement factor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescence protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphat-Phosphatase
3-HPA	3-Hydroxy-Pikolinsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
IPTG	Isopropylthiogalactosid

kDa	Kilodalton
LC-MS	liquid chromatography mass spectrometry
LDH	Lactatdehydrogenase
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionization time of flight
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase-Kaskade
MPAA	Mercaptophenylelessigsäure
NBD	N ³ -Nitrobenzofurazan-L-1,3-diaminopropionsäure
NCL	<i>Native Chemical Ligation</i>
NMPK	Nukleosidmonoposphatkinasen
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pfa	L-Phosphono-Difluormethylen-Alanin
PK	Pyruvatkinase
Pma	L-Phosphono-Methylen-Alanin
Rab	Ras genes from rat brain
RabGDI	Rab GDP dissociation inhibitor
RBD	Ras binding domain
REP	Rab escort protein
RGGT	Rab Geranylgeranyl-Transferase
RP-HPLC	reversed phase high performance liquid chromatography
RT	Raumtemperatur
SAMDI	self assembled monolayers desorption ionization
SDS	Natriumdodecylsulfat
SELDI-TOF	surface-enhanced laser desorption-ionization time of flight
SPPS	solid phase peptide synthesis
SV	Säulenvolumen
TCEP	Tris-(carboxyethyl)-phosphin
TDP	Thymidindiphosphat
TEAAc	Triethylammonium-Acetat
Tev	tobacco etch virus
TFA	trifluoro acetic acid
TMP	Thymidinmonophosphat
TMPK	Thymidinmonophosphat-Kinase

TTP	Thymidintriphosphat
VÄ	Volumen-Äquivalent
Ypt	Yeast protein transport

Ein- und Dreibuchstabencode der 20 codierten 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

1. Einleitung

1.1 Synthese von Protein-DNA-Konjugaten zur Herstellung eines Protein-Mikroarrays

Der Mensch versucht seit jeher die Prozesse des Leben zu verstehen, es zu erklären und seine Geheimnisse zu entschlüsseln. Dadurch wird es ihm möglich sich selbst in seine physikalische Umgebung einzuordnen und die Wechselwirkungen mit der „toten“ Materie zu erkennen. Denn nur ein System, das man kennt, kann man anschließend manipulieren.

So ist es der Grundlagenforschung zu verdanken, dass heute eine Reihe von epidemischen Krankheiten, wie zum Beispiel die Tuberkulose oder die Pocken, nahezu ausgerottet sind. Auch die alltäglichen Lebensumstände werden durch den Erfindungsgeist und den Forscherdrang der Naturwissenschaftler Stück für Stück verbessert. So zum Beispiel durch Arbeiten von Louis Pasteur und Anderen zur Haltbarmachung von Lebensmitteln.

Allerdings haben sich im Laufe der Jahrhunderte die Messmethoden und damit auch das Verständnis stark gewandelt. Was früher postuliert wurde – an sich schon eine Meisterleistung – kann heute nachgewiesen werden. Nicht zuletzt aus diesem Grund hat sich das Augenmerk in Bereichen, wie Mikrobiologie oder Genetik, immer weiter auf die molekulare Ebene verschoben. In den letzten 70 Jahren sind zahlreiche Entdeckungen gemacht worden, wie zum Beispiel die Entdeckung und industrielle Herstellung des Penicillins, Synthese des Insulins oder nicht zuletzt die Entschlüsselung der Genome zahlreicher Organismen (Fleming 1929; Meienhofer *et al.* 1963; Gregory *et al.* 2006).

Auch sind zahllose Stoffwechselfvorgänge und ihre Vernetzung untereinander aufgeklärt worden. Durch die moderne Biochemie gelingt es mittlerweile selbst Signaltransduktionswege aufzuklären. Dabei gelangen Information von außerhalb der Zelle vermittelt über Hormone über eine Reihe von Schritten in den Zellkern, wo sie eine Antwort der Zelle induzieren.

Ein Beispiel für Signaltransduktion und Zellproliferation ist die mitogen aktivierte Proteinkinase-Kaskade (MAPK) (Burgering und Bos 1995). Dabei spielt die kleine GTPase H-Ras (Guanosintriphosphat-Phosphatase) eine große Rolle (Barbacid 1987). Sie ist ein Membranassoziiertes Protein und über einen C-terminalen Lipidanker an die Membran gebunden (Hancock *et al.* 1990). Dort kann sie im aktivierten Zustand an c-Raf1 binden und das empfangene Signal weiterleiten.

Weitere Klassen von GTPasen sind neben den Proteinfamilien Rho und Ran auch die Rab-Proteinfamilie und ihre Verwandten aus der Hefe, die Ypt-Proteine (*Yeast protein transport/Ras genes from rat brain*). Sie alle gehören zur Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen.

GTPasen sind Guaninnukleotid-bindende Proteine, welche durch GEF's (*guanine nucleotide exchange factor*) von ihrer inaktiven Form in ihre aktive Form überführt werden. Der GEF katalysiert den Austausch des an die GTPase gebundenen GDP gegen GTP. Dabei findet eine Konformationsänderung statt, welche die Bindung an weitere Effektoren ermöglicht (Abb. 1.1). Das G-Protein wird wieder in seine inaktive Form überführt, indem durch GAP's (*GTPase-activating protein*) die intrinsische Hydrolyseaktivität angeregt wird und das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert wird. Dadurch kehrt das Protein in seine ursprüngliche, inaktive Konformation zurück. Dabei fungieren die GTPasen als molekulare Schalter (Takai *et al.* 2001).

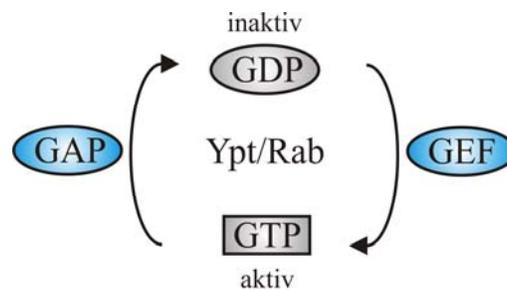


Abb. 1.1: Aktivierungs/ Inaktivierungszyklus der GTPasen. Durch ein GEF wird der GDP/ GTP-Austausch katalysiert und die GTPase damit aktiviert. Diese kann nun an weitere Effektoren binden. Anschließend wird durch ein GAP die intrinsische Hydrolyseaktivität der GTPase angeregt und das GTP zum GDP hydrolysiert. Dabei wird das Protein wieder inaktiviert.

Die Rab-Proteine, welche vor rund 30 Jahren entdeckt wurden, haben essentielle Funktionen in der Zelle. Die mittlerweile mehr als 60 (Bock *et al.* 2001) identifizierten Rab-Proteine regulieren den Transport von Hormonen, Neurotransmittern oder Membranproteinen, wie zum Beispiel Rezeptoren, zwischen Zellkompartimenten und sind ebenso an der Endocytose beteiligt, wie an der Sekretion (Zerial and McBride 2001).

Der Transport in der Zelle geschieht über Vesikel, welche aus einer Donormembran ausknospen und mit einer Akzeptormembran verschmelzen. Die GTPasen sind dabei in jeden einzelnen Schritt involviert, wie zum Beispiel der Bildung von Vesikeln, dem Transport zum Akzeptorkompartiment, die spezifische Erkennung, Verknüpfung und dem Verschmelzen des Vesikels mit der Membran.

Ebenso wichtig, wie der Aktivierungs/ Inaktivierungszyklus der Rab-Proteine, ist der Assoziations/ Dissoziationszyklus mit den Kompartimentmembranen. Das Ras-Protein trägt zu seiner Membranassoziation eine posttranslationale Farnesyl- und/oder Palmitoyl-Modifikation. Die Rab-Proteine hingegen tragen zwei Geranylgeranyl-Gruppen (Seabra 2000). Nach seiner Expression bindet das Rab an das *Rab escort protein* (REP). Dieser Komplex wird von der Rab Geranylgeranyl-Transferase (RGGT) erkannt, welche an ihn bindet und das Rab-Protein dann prenyliert.

Der Assoziations/ Dissoziationszyklus der Rab-Proteine ist in der Abbildung 1.2 skizziert. Dabei assoziiert das Rab-Protein, welches im Zytosol als Komplex mit dem REP vorliegt, durch seinen Lipidanker an die Membran und wird durch GDF (*GDI displacement factor*) vom REP oder RabGDI (*Rab GDP dissociation inhibitor*) freigesetzt (**B**). Anschließend bindet ein GEF und aktiviert die GTPase durch den Nukleotidaustausch (**C**) (Stenmark *et al.* 1994; Wu *et al.* 2010). Früher wurde angenommen, die GEF's seien integrale Membranproteine, aber heute weiß man, dass sie periphere Membranproteine sind, die weitere Faktoren zur Bindung an die Membran benötigen (Goud *et al.* 1988; Bourne 1988).

Nach erfolgter Rekrutierung von Effektorproteinen, wird das aktive Rab-Protein durch ein GAP wieder inaktiviert (**D**). Nach der Hydrolyse des GTP zu GDP bindet der RabGDI an das Rab-Protein, dissoziiert es von der Membran und gewinnt es damit zurück (**E**). Dabei bindet eine der Geranylgeranyl-Gruppen in einer hydrophoben Bindungstasche des GDI. Es wird angenommen, dass der andere Lipidanker an der GDI-Oberfläche liegt. Dies könnte die nächste Assoziation an eine Membran vereinfachen (Araki *et al.* 1990; Shen *et al.* 1996).

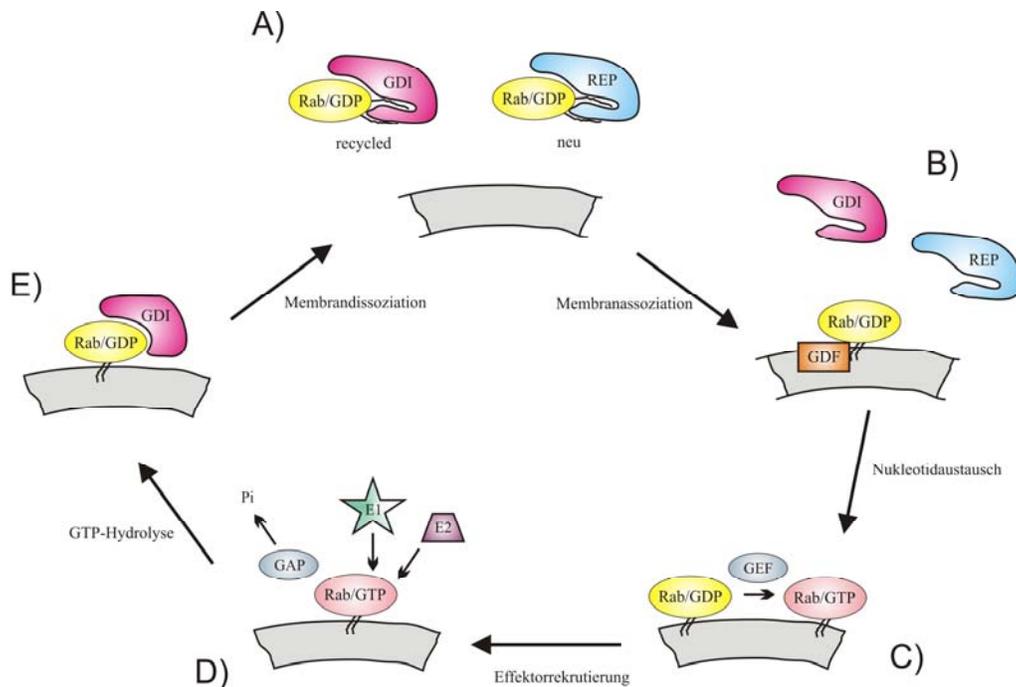


Abb. 1.2: Assoziations/ Dissoziationszyklus der Rab-Proteine an Membranen.

Der RabGDI und das REP sind sich in ihrer Sequenz und Struktur sehr ähnlich und unterscheiden sich nur in einigen wenigen Aminosäureresten an der Bindungsfläche (Rak *et al.* 2003).

Mutationen im REP-1, einer der beiden Isoformen des REP, welche zur Inaktivierung des Proteins führen, sind auch der Grund für eine der drei bekanntesten Krankheiten, die mit dem vesikulären Transport in Zellen zusammenhängen (Seabra 1996). Choroideremia ist eine langsame progressive Degeneration des retinalen Pigmentepithels und der Aderhaut (Choroidea), welche zu Blindheit führt (Heckenlively und Bird 1988; Syed *et al.* 2001).

Andere bekannte Krankheiten sind das Hermansky-Pudlak Syndrom, welches auf Mutationen in der Rab Geranylgeranyl-Transferase beruht und unter anderem zu Albinismus führt (Detter *et al.* 2000) und das Griscelli Syndrom, die bisher einzige bekannte mit vesikulären Transport zusammenhängende Krankheit, bei der ein nicht funktionelles Rab-Protein, das Rab27a, beteiligt ist (Griscelli und Prunieras 1978; Klein *et al.* 1994).

Aufgrund der mit den Transportvorgängen in der Zelle verbundenen Krankheiten, welche oft einen tödlichen Verlauf nehmen, ist es eine Notwendigkeit die komplizierten Netzwerke zu seiner Regulierung vollständig aufzuklären. Nur so können Ansätze zur Therapie gefunden werden, oder gar eine vollständige Heilung erreicht werden.

Um diesem Ziel näher zu kommen, müssen die beteiligten GEF's, GAP's und Effektoren der Rab-Proteine gefunden werden, und in einem weiteren Schritt die zugrunde liegenden Mechanismen ihrer Rekrutierung, Bindung und Aktivierung entschlüsselt werden.

Da aber die Rab-Protein-Familie mit rund 70 Mitgliedern sehr groß ist, was zum Beispiel parallele Ansätze zur Aufklärung der Transportvorgänge sehr erschwert, wird häufig die Ypt-Protein-Familie, ihr Hefeanalogen, zu Untersuchungen herangezogen. Sie ist mit nur 11 Mitgliedern überschaubar.

Vier der Ypts (Ypt1, Ypt31/32, Sec4) haben definierte Rollen bei der Exocytose und sind für die Lebensfähigkeit der Zelle essentiell, vier (Ypt51/52/53, Ypt7) sind an der Endocytose beteiligt und nicht unbedingt lebensnotwendig für die Zelle. Die Funktion des Ypt6 ist immer noch umstritten (Segev 2001).

Die ersten entdeckten Ypt-Proteine waren das Sec4 (Salminen und Novick 1987) und das Ypt1 (Segev *et al.* 1988). Dabei ist das Ypt1 beteiligt am Transport vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum cis Golgi und vom cis Golgi zum medialen Golgi (Bacon *et al.* 1989; Baker *et al.* 1990; Jedd *et al.* 1995). Es zeigt eine Sequenzhomologie von 71 % zu seinem mammalianen Gegenstück Rab1 und ist mit diesem austauschbar bei Beibehaltung der Lebensfähigkeit der Zelle (Haubruck *et al.* 1989).

Bei diesem Transportschritt wird das Ypt1 vermutlich zwei mal aktiviert und deaktiviert. Zuerst knospen COPII bedeckte Vesikel aus dem ER aus. Das an die Membran assoziierte Ypt1 wird von einem noch unbekanntem GEF aktiviert und kann den Effektor Uso1 binden (Allan *et al.* 2000). Nach der Inaktivierung des Ypt1 geht der Effektor Uso1 vermutlich eine konformationelle Änderung ein und ist dafür verantwortlich anschließend die Zielmembran am cis Golgi zu erkennen und gemeinsam mit dem GM130 eine erste Verbindung mit ihr herzustellen (Short *et al.* 2005; Shorter und Warren 2002). In der Nähe der Membran des Golgi-Apparates wird Ypt1 erneut durch den TRAPP-1-Komplex aktiviert (Jones *et al.* 2000) und der COG-Komplex kann als weiterer Effektor an das Ypt1 binden (Suvorova *et al.* 2002). Der TRAPP-1-Komplex besteht aus 8 Untereinheiten und ist spezifisch für Ypt1, aber beim Transport aus dem Golgi-Apparat heraus, an dem das Paar Ypt31/32 beteiligt ist fungiert ein veränderter TRAPP-2-Komplex mit zwei zusätzlichen Einheiten als GEF (Sacher *et al.* 2001; Cai *et al.* 2005). Es ist also wahrscheinlich, dass eine Kaskade existiert und das Ypt1 mit seinem GEF gleichzeitig das GEF für den nächsten Schritt, an dem das Ypt31 beteiligt ist, rekrutiert.

Die Tabelle 1.1 zeigt eine Auflistung der bekannten Bindungspartner der Ypt-Proteine.

1. Einleitung

Tabelle 1.1: Bekannte Bindungspartner der Ypt-Proteine

	GEF	GAP	Effektor
Ypt1	TRAPPI DSS4		Uso1
Sec4	Sec2	Gyp1, 2, 3, 4	Sec15
Ypt6	Ric1 Rigp1	Gyp2, 3, 4, 6	
Ypt7	HOPS Vps39	Gyp4, 7	Vam2, 6 HOPS
Ypt10			
Ypt11			
Ypt31/32	TRAPPII		Sec2
Ypt51	Vps9	Gyp1, 3	Vac1
Ypt52			
Ypt53			

Eine Möglichkeit die Aktivierungs/ Deaktivierungskaskade des Ypt1 und auch die der anderen Ypt-Proteine aufzuklären, ist die Nutzung der Protein-Mikroarray-Technologie.

Erste Veröffentlichungen zur Immobilisierung von Proteinen liegen schon 40 Jahre zurück. So haben Silman *et al.* 1966 biologisch aktive Antikörper auf festen Trägern immobilisiert. Generell kann man zwischen zwei hauptsächlich Anwendungen von Protein-Chips unterscheiden.

Die erste ist die Quantifizierung von einzelnen Zielproteinen aus komplexen Gemischen, wie Zellysaten oder Blutproben. Diese Anwendung kann zum Beispiel in der klinischen Diagnostik genutzt werden.

Auch für Proteomanalysen sind Protein-Mikroarrays nützlich, da *mRNA*-Studien über DNA-Chips keinerlei posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung, Acetylierung oder Phosphorylierung berücksichtigen können.

Die zweite Anwendung ist die Erforschung von Proteinfunktionen, wie die molekulare Erkennung von Wirkstoffen, Hormonen oder Metaboliten (Fang *et al.* 2002), die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen (Ramachandran *et al.* 2004) oder Protein-DNA-Wechselwirkungen (Hall *et al.* 2004).

Vorteile der Protein-Mikroarray-Technologie sind, in Analogie zu DNA-Chips, Automatisierung und eine parallele Detektion. Ein weiterer Vorteil ist, dass sehr kleine Probenvolumina verwendet werden können.

Allerdings gilt es einige Schwierigkeiten zu überwinden, bevor diese Anwendungen möglich werden. So muss das Fängermolekül, ein kleines organisches Molekül, ein Peptid oder Protein, zunächst auf dem Chip immobilisiert werden. Dazu gibt es grundsätzlich vier verschiedene Ansätze: Unspezifisch/ nicht kovalent, unspezifisch/ kovalent, spezifisch/ kovalent und spezifisch/ nicht kovalent (Abb. 1.3).

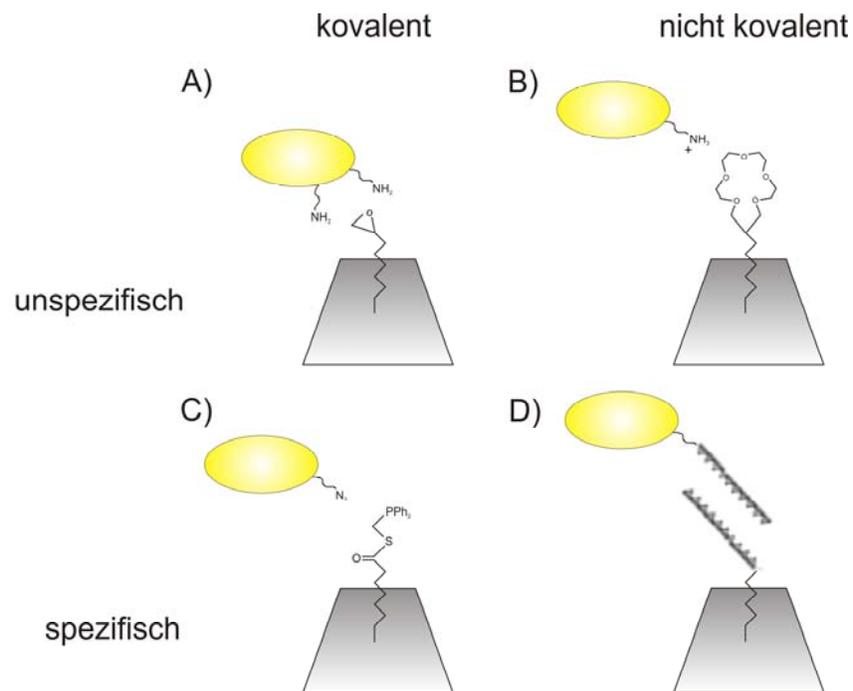


Abb. 1.3: Die vier grundsätzlichen Strategien zur Immobilisierung von Proteinen, an Beispielen gezeigt. A: Epoxygruppen/ Aminogruppen; B: CalixKrone-5-Derivate/ Aminogruppen; C: Staudingerligation; D: DNA directed immobilization.

Im Folgenden werden Beispiele für die verschiedenen Ansätze vorgestellt. Dabei ist zu beachten, dass für anschließende Messungen bei allen Methoden der Immobilisierung die native Konformation eines Proteins möglichst erhalten bleiben muss. Ansonsten können seine Aktivität oder Bindungseigenschaften verändert werden oder vollständig verloren gehen. Außerdem ist es von Vorteil, wenn die Proteine nicht statistisch auf der Oberfläche orientiert sind, sondern eine uniforme Ausrichtung zeigen. Auch Bindungsflächen oder Taschen und aktive Zentren dürfen nicht unzugänglich gemacht werden.

Eine Möglichkeit zur unspezifisch/ nicht kovalenten Immobilisierung (Abb. 1.3 **B**) bieten CalixKrone-5-Derivate (Lee *et al.* 2003). Hierbei sind mit Thiol- oder Aminogruppen versehene Calixarene auf Glaträgern oder Goldoberflächen kovalent gebunden. Über eine Krone-5-Modifizierung des Calixarens können die Aminogruppen von Proteinen an die Oberfläche binden.

Für den zweiten Ansatz verwendet man funktionalisierte Oberflächen, an die die Proteine kovalent gekoppelt werden (Abb. 1.3 **A**). So können die Oberflächen zum Beispiel mit Epoxygruppen (Zhu *et al.* 2000), Aldehydfunktionen (MacBeath und Schreiber 2000) oder Isothiocyanatgruppen (Benters *et al.* 2001) versehen werden.

Die spezifische, kovalente Immobilisierung (Abb. 1.3 **C**) kann zum Beispiel durch die Staudinger Ligation (Watzke *et al.* 2006) oder die native chemische Ligation (Uttamchandani *et al.* 2004) bewerkstelligt werden. Diese beiden Kopplungsmethoden erhalten ihre hohe Spezifität durch ihre Bioorthogonalität, denn das Azid-Phosphin-Paar und der C-terminale α -Thioester kommen in der Natur an Proteinen nicht vor, wodurch ungewollte Reaktionen vermieden werden.

Zum letzten Ansatz sollen zwei Beispiele aufgezeigt werden. Nicht kovalent aber hochspezifisch (Abb. 1.3 **D**) können die Proteine über Affinitätstags oder DNA-Konjugate gebunden werden. So kann die Chip-Oberfläche mit Nickel beschichtet werden und das Protein über einen His-tag binden (Becker *et al.* 2001) oder aber das Protein über eine Biotin-Modifizierung an auf den festen Träger immobilisiertes Avidin binden (Lesaicherre *et al.* 2002).

Protein-DNA-Konjugate können über die *DNA directed immobilization* (DDI) auf übliche DNA-Mikroarrays aufgebracht werden. Durch die spezifische Sequenz ist das Konjugat adressierbar (Niemeyer *et al.* 1994; Becker *et al.* 2005). Dieser Ansatz nutzt die gesammelten Erfahrungen der DNA-Chiptechnologie für die Immobilisierung von Proteinen.

Das Konzept der DNA-Mikroarrays wurde erstmals im Jahr 1995 von P. O. Brown eingeführt (Skena *et al.* 1995). Die Stärke der DNA-Chiptechnologie liegt darin, dass auf einer sehr kleinen Fläche eine sehr große Anzahl an unterschiedlichen Sonden aufgebracht werden kann, und somit aus einer einzigen Probenlösung, parallel in einem Schritt, tausende oder gar hunderttausende von DNA-Sequenzen detektiert werden können. So wurden zum Beispiel von Affymetrix durch Photolithographie DNA-Chips mit einer Dichte von 10^6 Oligonukleotidsequenzen pro cm^2 dargestellt (Mcgall *et al.* 1996).

Als festes Trägermaterial für die Chips werden am häufigsten Glas oder Silizium-Träger verwendet, da sie einfach zu modifizieren sind (Benters *et al.* 2001). Auf die aktivierten

Oberflächen kann das Oligonukleotid dann durch *Mikrospotting* (Lamture *et al.* 1994) oder *Inkjetting* (Okamoto *et al.* 2000) aufgebracht und an das Spacer/ Linker-System gekoppelt werden. Bei der Methode der Photolithographie (Mcgall *et al.* 1996) wird das Oligonukleotid durch Phosphoramiditsynthese direkt auf dem Träger synthetisiert. Bei Zugabe einer markierten Analytlösung, die ein komplementäres Oligonukleotid enthält, hybridisiert dieses an dem immobilisierten Strang und erzeugt ein Signal, das detektiert werden kann.

Zur Darstellung von Protein-DNA-Konjugaten können diverse Reaktionen, basierend auf verschiedenen funktionellen Gruppen, herangezogen werden. So können die Proteine beispielsweise durch Aldehyd- und Hydrazingruppen über eine Hydrazonebildung gekoppelt (Kozlov *et al.* 2004) oder aber durch Maleinimidfunktionalisierung an Thiole addiert werden (Boozer *et al.* 2006). Auch eine Fusion über die Staudingerligation ist möglich (Grandjean *et al.* 2005).

Eine weitere Methode zur Darstellung von Protein-DNA-Konjugaten ist die native chemische Ligation. Die native chemische Ligation wurde in den 90iger Jahren von Stephen Kent (Dawson *et al.* 1994) eingeführt, um entschützte Peptide chemoselektiv miteinander zu verknüpfen, was den Weg zur Synthese kleiner bis mittelgroßer vollsynthetischer Proteine eröffnete. Bei dieser Ligationsmethode wird eine native Peptidbindung unter wässrigen Bedingungen und bei physiologischen pH-Wert (7-8) geknüpft. Dabei greift die Thiolgruppe eines N-terminalen Cysteins eines Peptidsegmentes nucleophil den C-terminalen α -Thioester eines zweiten Peptidsegmentes an. Anschließend findet ein S \rightarrow N Acyltransfer der Aminogruppe des Cysteins statt, welcher irreversibel ist und die native Peptidbindung knüpft. Diese Art der Umlagerung wurde schon 1953 von Wieland *et al.* beschrieben.

So kann beispielsweise ein Cystein-modifiziertes Oligonukleotid mit einem Protein verknüpft werden, welches C-terminal einen α -Thioester trägt (Lovrinovic und Niemeyer 2005).

Die Art der Detektion der Analyten und die Nachweisgrenze sind essentiell für die Anwendung. So können bei Protein-Arrays Fluoreszenzmethoden verwendet werden (McBeath *et al.* 2000; Zhu *et al.* 2001). Ein Nachteil ist, dass der Analyt oftmals vor der Messung erst noch fluoreszenzmarkiert werden muss. Bei Antikörperarrays besteht sogar die Möglichkeit eines Sandwichkomplexes mit zwei Antikörpern, was die Sensitivität der Analyse stark erhöht. Dies ist zum Beispiel bei einem *Enzyme-linked immunosorbent Assay* (ELISA) der Fall.

Auch bei der Detektion *via* Isotopenmarkierung und durch Chemolumineszenz müssen die Analyten mit Radioisotopen (Zhu *et al.* 2001) oder funktionellen Einheiten markiert werden. Als weitere Methoden sind massenspektrometrische Ansätze, wie MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization time of flight*) (Heintz *et al.* 2004) SELDI-TOF (*surface-enhanced laser desorption-ionization time of flight*) (Tang *et al.* 2004) oder SAMDI (*self assembled monolayers desorption ionization*) (Su und Mrksich 2002) zu erwähnen. Vorteile sind, dass die Probe vorher nicht markiert zu werden braucht und dass man über die Probe mehr Informationen erhält, als eine einfache „Ja oder Nein“- Antwort, nämlich die Masse des bindenden Proteins. Außerdem besteht noch zusätzlich die Möglichkeit ein bindendes Protein durch spezielle MS/MS-Methoden zu sequenzieren (Spengler 2004). Allerdings ist es sehr anspruchsvoll mittels Massenspektrometrie zu quantifizieren.

1.2 Semisynthese der Thymidinmonophosphat-Kinase

Die Thymidinmonophosphat-Kinase (TMPK) ist durch ihre Zugehörigkeit zu den Nukleosidmonophosphatkinasen (NMPK) ebenso, wie die Proteine der Rab/Ypt-Familie, ein Nukleodid-bindendes Protein. Sie katalysiert die Übertragung der γ -Phosphatgruppe eines Adenosintriphosphats (ATP) auf ein Thymidinmonophosphat (TMP).

Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, verläuft jedoch vermutlich, ähnlich zu den anderen NMPK's, nach einem Random-Bi-Bi Mechanismus (Li *et al.* 1996; Sheng *et al.* 1999).

Die TMPK ist als Homodimer aktiv und benötigt zur Stabilisierung der Nukleotide in der Bindungstasche ein Mg^{2+} -Ion, welches mit den Phosphatgruppen koordiniert. Zur Bindung seiner Substrate und zur Phosphatgruppenübertragung hat die Kinase noch vier weitere Sequenzmotive: Den *P-loop*, die LID-Region, das DR-Motiv und den *Adenin-binding-loop* (Abb. 1.4).

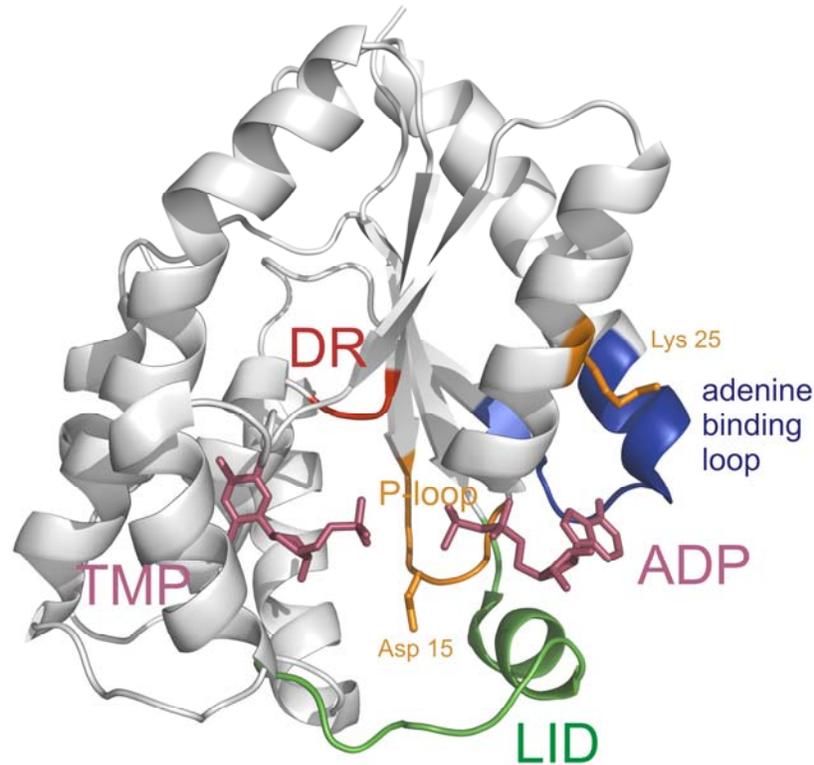


Abb. 1.4: Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit ADP und TMP (Ostermann et al. 2000). Die vier Bindungsmotive des P-loops, des DR-Motivs, des Adenin-Bindungs-loops und der LID-Region sind farblich gekennzeichnet.

Die TMPK ist ein essentielles Enzym, da sie sowohl über den „*de novo*“-Weg, als auch über die Rückgewinnung, den „*salvage pathway*“, an der Biosynthese des für die Zelle lebensnotwendigen Thymidintriphosphats (TTP) beteiligt ist. Sie ein potentielles Ziel für eine Krebstherapie, da eine Inhibierung der TMPK und damit eine Inhibierung der TTP-Synthese zu verringerter Zellvermehrung und zu einer Hemmung eines Tumorwachstums führen kann. Aber die Rolle der TMPK bei der Aktivierung von Vorläufermedikamenten gegen virale Erkrankungen, wie z. B. HIV, ist weit bedeutender. Ebenso, wie beim TMP, katalysiert die TMPK die Phosphorylierung von nukleosidischen Vorläufermedikamenten auf Thymidin-Basis.

Nukleosidische Medikamente können grundsätzlich auf zwei Arten gegen das HI-Virus eingesetzt werden. Im ersten Replikationszyklus des Virus können sie entweder die reverse Transkriptase kompetitiv hemmen, oder aber, da sie meist 3'-modifiziert sind, während der Virus-DNA-Synthese einen Strangabbruch hervorrufen (Arts und Wainberg 1996).

Aufgrund ihrer hohen Polarität können die aktiven Nukleotide nicht direkt von der Zelle aufgenommen werden (Neuhard und Nygaard 1987). Daher werden nicht phosphorylierte

Vorläufer-Medikamente, wie das 3'Azido-3'deoxythymidin (AZT), verabreicht, welche durch Diffusion in die Zellen gelangen können (Zimmermann *et al.* 1987). Dort wird das AZT durch drei zelluläre Kinasen, der Thymidinkinase, der Thymidinmonophosphat-Kinase und der Basen-unspezifischen Nukleosiddiphosphatkinase zum aktiven AZT-Triphosphat (AZTTP) umgewandelt. Die Anforderungen an diese Klasse von Inhibitoren sind groß. So müssen sie einerseits effizient in ihr Triphosphat umgewandelt werden können, andererseits eine hohe Selektivität gegenüber der reversen Transkriptase besitzen, um toxische Effekte durch Bindung an die zelleigene DNA-Polymerase zu vermindern. Die auf Thymidin basierenden Analoga zeigen die erwünschte Selektivität zur reversen Transkriptase.

Allerdings ist die Phosphorylierung von Thymidin verglichen mit anderen Nukleosidkinasen nicht effizient. Die TMPK ist dabei der Geschwindigkeit-bestimmende Schritt. Und da die Umwandlung des AZT-Monophosphat (AZTMP) wesentlich langsamer ist, als die Phosphorylierung des TMP akkumuliert das AZTMP in der Zelle, während nur 4 % des eingesetzten AZT in AZT-Diphosphat (AZTDP) oder AZTTP umgewandelt werden (Qian *et al.* 1994). Dies führt zu einigen unerwünschten Nebeneffekten. Einerseits führt die Toxizität der Intermediate zu Nebenwirkungen, andererseits kann der Virus, durch die schwache Präsenz an aktivem Wirkstoff, resistente Varianten bilden, welche die gesamte Therapie gefährden (Törnevik *et al.* 1995).

Da die TMPK anderer Organismen, wie zum Beispiel *E. coli*, wesentlich schneller in der Umsetzung des AZTMP sind (Lavie *et al.* 1998), könnte die Pharmakomodulation dieses Problem lösen (Caruso und Klatzmann 1994). So könnte ein Gen spezifisch in die Zielzellen eingeschleust werden, welches für eine modifizierte TMPK codiert. Im Idealfall sollte sie selektiv und effizient AZTMP zu AZTDP phosphorylieren nicht jedoch das natürliche Substrat TMP. Es sollte dabei allerdings die menschliche TMPK verwendet werden, da sie die Wahrscheinlichkeit einer Immunreaktion auf das Enzym minimiert. Ansätze zur Steigerung der TMPK-Aktivität durch Austausch einiger Bereiche in den beteiligten *loop*-Regionen durch *E. coli*-TMPK-Sequenzbereiche wurden schon von Ostermann *et al.* (2000) vorgenommen. Diese basieren auf dreidimensionalen Strukturen der verschiedenen TMPK mit unterschiedlichen gebundenen Substraten.

Durch eine in ihrer Aktivität gesteigerte TMPK-Variante könnte die Konzentration an AZTTP in der Zelle gesteigert und die oben genannten Nebenwirkungen weitestgehend unterdrückt werden. Aber ein effizienter und nebenwirkungsfreier Transfer des Gens in die Zielzellen wird dabei der limitierende Schritt werden.

Um die Aktivität der TMPK zu steigern und damit die Metabolisierung des AZT effizienter zu gestalten, muss allerdings der zugrunde liegende Mechanismus der Phosphatgruppenübertragung im Detail verstanden werden.

Ein wichtiger Aminosäurerest ist dabei die Asparaginsäure 15 im *P-loop*. Kristallstrukturen haben gezeigt, dass die Seitenkette des Asp15 mit der 3'-OH-Gruppe des TMP entweder als Bindungspartner wechselwirkt oder als katalytischer Rest fungiert. Der Austausch gegen andere Aminosäuren führte zum Verlust der TMPK-Aktivität (Brundiars *et al.* 1999), daher ist das Asp15 essentiell für die TMPK.

Ein Austausch des Asp15, beispielsweise über Protein-Semisyntese, gegen eine Phosphono-Variante wie L-Phosphono-Methylen-Alanin, oder seine fluorierte Version das L-Phosphono-Difluormethylen-Alanin kann den pK_a -Wert der Seitenkette herabsenken. Durch die Deprotonierung bei physiologischen Bedingungen könnten mehr Erkenntnisse über die Funktion dieses Aminosäurenrestes und damit über den Mechanismus der Phosphatgruppenübertragung gewonnen werden.

Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die selektive Modifikation von Nukleotid-bindenden Proteinen, wie der Ypt-Familie oder der menschlichen Thymidinmonophosphatkinase (TMPK) durch Kombination von chemischen und molekularbiologischen Methoden.

Die effiziente Bildung von Protein-DNA-Konjugaten soll die Grundlage schaffen über den Ansatz der DNA-vermittelten Immobilisierung (DDI) einen Protein-Mikroarray der gesamten Ypt-Familie herzustellen. Durch die Mikroarray-Technologie soll es ermöglicht werden aus komplexen Hefe-Zelllysaten heraus, in parallelen Experimenten, Bindungspartner der Proteine, wie GEF's, GAP's oder Effektoren mittels Massenspektrometrie zu finden und zu identifizieren. Dies ist nötig, um die komplexen Transportvorgänge in eukaryotischen Zellen besser zu verstehen. Eine Übertragung dieses Prinzips auf die Rab-Protein-Familie kann dann dazu verwendet werden, auch die mammalischen Transportnetzwerke zu verstehen und somit gegen Krankheiten, wie das Griscelli Syndrom, effektiv vorgehen zu können.

Die exprimierten Proteine sollen mit den modifizierten Oligonukleotiden durch chemische Ligation verknüpft werden. Die gebildeten Konjugate werden dann durch Hybridisierung auf den DNA-Mikroarrays immobilisiert. So ist es über diesen Ansatz zur Immobilisierung möglich Protein-Mikroarrays für nahezu jedes Protein oder jede Protein-Familie zu erstellen, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen oder in der klinischen Diagnostik verwendet zu werden.

Ein zweites Projekt ist die Protein-Semisynthese der TMPK. Sie ist ebenso, wie die Ypt-Protein-Familie, ein Nukleotid-bindendes Protein. Zur Semisynthese wird ein Segment des Proteins rekombinant, der andere Teil über Peptidsynthese hergestellt. Die Verknüpfung der beiden Segmente findet dabei ebenso, wie im Fall der Protein-DNA-Konjugate, über native chemische Ligation statt. Dadurch wird ein Weg eröffnet beliebige Modifikationen, wie künstliche Aminosäuren oder Fluoreszenzmarker, in das aktive Zentrum des Proteins einzufügen. Diese erlauben dann Untersuchungen des Phosphatgruppen-Übertragungsmechanismus von ATP zu TMP. Durch das vollständige Verständnis dieses Mechanismus können TMPK-Varianten geschaffen werden, welche in der Metabolisierung von HIV-Vorläufer-Medikamenten, wie dem AZT, effizienter sind und die Akkumulierung von toxischen Zwischenprodukten verhindern

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von p. a. Qualität und stammten von den Firmen J. T. Baker (Groß-Gerau), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma- Aldrich (Steinheim).

Das DNA Ultrafast Cleavage and Deprotection Reagent wurde bei der Firma Beckman Instruments (Fullerton CA) erstanden.

Die für die Zellanzucht verwendeten Antibiotika waren von Gerbu (Gaiberg), Nährmedien (Bacto Trypton und Hefe-Extrakt) von BD Biosciences (Heidelberg).

Der verwendete LMW-Proteinmarker enthielt α -Lactalbumin (14,4 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Albumin (66 kDa) und Phosphorylase b (97 kDa) und wurde von Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire) bezogen.

Der 1kb DNA-Molekulargewichtsstandard und der SeeBlue Plus2 prestained LMW-Proteinmarker stammten von Invitrogen (Leek).

Der verwendete Gelfiltrationsstandard enthielt Thyroglobulin (670 kDa), Rinder- γ -Globulin (158 kDa), Hühner-Ovalbumin (44 kDa), Pferde-Myoglobin (17 kDa) und Vitamin B₁₂ (1,35 kDa) und wurde bei Bio-Rad (München) erstanden.

Das polymere Trägermaterial für die Festphasensynthese der Peptide wurde von Novabiochem (Schwalbach) bezogen.

Die Chitin beads wurden von der Firma New England Biolabs (Ipswich MA) bezogen.

Oligonukleotide und Primer waren von Metabion (Martinsried).

2.2 Instrumentation

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in temperierbaren Schüttlern der Firma Invors AG (Bottmingen) unter aeroben Bedingungen.

Die Elektrottransformation kompetenter *E. coli* Zellen wurde mittels eines *E. coli*-Pulser der Firma Biorad (München) in Elektroporationsküvetten der Firma Invitrogen (Leek) durchgeführt.

Sedimentationen erfolgten in den Zentrifugen RC28S und Avanti J20XP der Firmen Sorvall (Bad Homburg) und Beckmann Coulter in den Rotoren F28/36 sowie JLA 8.1000.

Der Zellaufschluss wurde durch den Mikrofluidizer des Typs M-110S der Firma Microfluidics Corp. (Newton) durchgeführt.

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen erfolgten mit dem Mini-PROTEAN III-System der Firma Biorad.

Zur Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) wurden Anlagen der Firmen Beckmann (System Gold) und Waters verwendet. Die verwendeten Säulen wurden von den Firmen Bischoff Chromatography, YMC und Vydac bezogen.

Für Größenausschluss-Chromatographie wurden Systeme der Firma Amersham Biosciences benutzt, die entsprechenden Säulen waren von Amersham Pharmacia und Phenomenex (Aschaffenburg).

Zur Messung von Massenspektren wurde ein Voyager-DE Pro MALDI-Massenspektrometer von Perseptive Biosystems (Weiterstadt), ein Ultraflex TOF/TOF von Bruker Daltonics, sowie das ESI-MS LCQ Advantage MAX (Finnigan) verwendet.

UV-Messungen wurden am Bio Photometer von Eppendorf (Hamburg), am GeneQuant von Pharmacia Biosystems, am Biomat3 von Thermo electron Corporation, Ultrospec 2100 pro von Amersham Biosciences und am DU 640 Spectrophotometer von Beckman Coulter vorgenommen.

Fluoreszenzmessungen wurden am Fluoromax-5000 von FujiFilm und am Typhoon 9200 von Amersham Pharmacia Biotech vorgenommen.

Zum Einengen von Proben und Entfernen von Lösungsmitteln wurde die Speedvac Plus SC110A von Savant verwendet.

2.3 Lösungen und Puffer für molekularbiologisches Arbeiten

Tabelle 2.1: Lösungen und Puffer für molekularbiologisches Arbeiten

Puffer	Inhaltstoffe
TBE-Puffer	89 mM Tris pH 8,3 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
DNA-Probenpuffer 3 x	10 % Ficoll 400 0,025 % (w/v) Bromphenolblau 0,025 % (w/v) Xylencyanol in TBE-Puffer
Lösung 1	25 mM Tris pH 8,0 50 mM Glucose 10 mM EDTA
Lösung 2	200 mM NaOH 10 % (w/v) SDS
Lösung 3	3 M Kaliumacetat pH 5,5 (Essigsäure)
Ligasepuffer	5 x T4 Ligasepuffer (Invitrogen)
PCR-Puffer	10 x Pfu-Polymerasepuffer (Stratagene)
Nukleasepuffer	10 x Restriktionspuffer A, B (Boehringer-Mannheim)

2. Material und Methoden

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Nährmedien

2TY-Medium	16 g/l Tryptonhydrolysat 10 g/l Hefehydrolysat 5 g/l NaCl
2TY-Amp-Medium	2TY-Medium 100 µg/ml Ampicilin
2TY-Amp-Platten	2TY-Medium 16 g/l Select Agar 100 µg/ml Ampicilin
2TY-Amp-Cam-Medium	2TY-Medium 100 µg/ml Ampicilin 30 µg/ml Chloramphenicol
2TY-Amp-Cam-Platten	2TY-Medium 16 g/l Select Agar 100 µg/ml Ampicilin 30 µg/ml Chloramphenicol
Ampicilin-Stammlösung	100 mg/ml Ampicilin in Wasser
Chloramphenicol-Stammlösung	30 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol

2.4 Lösungen und Puffer für Proteinchemisches Arbeiten

Lämmli Gele

Tabelle 2.3: Inhaltstoffe der Lämmli Puffer

Puffer	Inhaltstoffe
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
Laufpuffer	25 mM Tris 0,2 M Glycin 1 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer 2 x	950 µl Lämmli sample buffer (Bio-Rad) 50 µl β-Mercaptoethanol

2. Material und Methoden

Silberfärbung

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der Lösungen zur Silberfärbung

Lösung (je 50 ml)	Inhaltstoffe
Fixierlösung	40 % Methanol 10 % Essigsäure
Inkubationslösung	15 ml Ethanol 3,4 g NaAc·3 H ₂ O 0,1 g Natrium Thiosulfat·5 H ₂ O
Silbernitratlösung	0,05 g AgNO ₃ 30 µl 36 % Formaldehyd
Entwicklerlösung	1 g Na ₂ CO ₃ · 1 H ₂ O 15 µl 36 % Formaldehyd
Stopplösung	0,04 M EDTA pH 8,0 10 % Glycerin

Coomassie-Färbung

Tabelle 2.5: Zusammensetzung der Färbe- und Entfärbelösung

Lösung	Inhaltstoffe
Coomassie-Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie R250 10 % (v/v) Essigsäure 40 % (v/v) Methanol in Wasser
Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure 40 % (v/v) Methanol in Wasser

PBS-Puffer: 140 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
1,8 mM KH₂PO₄
pH 7,3

2.5 Bakterienstämme und Oligonukleotide

Bakterienstämme:

XL1-Blue (Stratagene)

BL21(DE3) (Stratagene)

BL21(DE3)RIL (Stratagene)

Plasmide:

pGEXRB

pRSDNAK1-18HisTev

pTWIN1 NEB (Frankfurt a. M.)

Oligonukleotide:

Alle folgenden Oligonukleotide und Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen.

A: 5'-C6-Aminolink-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'
A_{kompl}: 5'-Biotin-TCC TGT GTG AAA TTG TTA TCC GCT-3'
B: 5'-C6-Aminolink-CTG AGG TAG GTA GAT CAC TTG AGG T-3'
C: 5'-C6-Aminolink-ATG TGA CCT GTA TTG TTG GAT GTG AG-3'
D: 5'-C6-Aminolink-ACT ATC CCA CGA ACG CTC A-3'
D_{kompl}: 5'-Biotin-TGA GCG TTC GTG GGA TAG T-3'
D_{Cy5}: 5'-Cy5-ACT ATC CCA CGA ACG CTC A-3'
E: 5'-C6-Aminolink-GGA CGA ATA CAA AGG CTA CAC G-3'
F2: 5'-C6-Aminolink-CAG CCA AGA TTC TTT TAC CGC C-3'
F2_{Cy5}: 5'-Cy5-CAG CCA AGA TTC TTT TAC CGC C-3'
F3: 5'-C6-Aminolink-CCA TCA TGT GTG CCG AGA TAT G-3'
F4: 5'-C6-Aminolink-CTT CTC CTA ACT GCA CGG AAT G-3'
F6: 5'-C6-Aminolink-GTC CTC GCC TAG TGT TTC ATT G-3'

Primer:

MXE_{rev}: 5'-GGC ACG ATG TCG GCG ATG-3'
P1: 5'-GAA GCG CTC TTC GTG CGC CGC GGG CCA-3'
T7_{promotor}: 5'-TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG GAA-3'
pGEX_{for}: 5'-GCA-TGG-CCT-TTG-CAG-GGC-TG-3'
pGEX_{rev}: 5'-CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG-3'
RPS09: 5'-CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG-3'

Matrices für MALDI-TOF-Massenspektrometrie:

3-HPA (Oligonukleotide):

3-Hydroxy-Pikolinsäure in MeCN/H₂O 50:50 ges./ Diammoniumcitrat in H₂O (50 mg/ ml)
8 : 1 (v/v)

CHCA (Proteine):

α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure ges. in MeCN/ H₂O 50:50 + 0,1 % (v/v) TFA

2.6 HPLC-Puffer

Triethylammonium-Acetat (TEAAc) Puffer:

A: 100 mM TEAAc in H₂O, pH 7,0
B: 100 mM TEAAc in H₂O/ MeCN 1:1, pH 7,0

RP-HPLC-Puffer:

C: H₂O + 0,1 % (v/v) TFA
D: Acetonitril + 0,08% (v/v) TFA

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Zellanzucht

Die Anzucht der *Escherichia Coli* Stämme XL1-Blue, BL21(DE3) und BL21(DE3)RIL erfolgte in 2TY-Medium mit entsprechenden Antibiotika unter aeroben Bedingungen bei

37°C und ca. 130 rpm. Das Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm kontrolliert.

2.7.2 UV-photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde durch Messung der optischen Dichte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt. Der Nullabgleich wurde mit dem reinen Lösungsmittel durchgeführt. Dabei gilt für die Konzentration einer Lösung in einer Küvette der Schichtdicke 1 cm:

dsDNA: 1 OD₂₆₀ entspricht 50 µg/ml

ssDNA: 1 OD₂₆₀ entspricht 30 µg/ml

Der Reinheitsgrad von DNA kann aus dem Verhältnis der beiden Absorptionen bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt werden. Bei reiner DNA beträgt der Quotient aus OD₂₆₀/ OD₂₈₀ ~ 1,8.

2.7.3 Agarosegelelektrophorese zur DNA-Auftrennung

Die Kontrolle von DNA-Fragmenten erfolgte mittels elektrophoretischer Trennung in Agarosegelen (0,8 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer mit 600 ng/ml EtBr) bei konstanter Spannung 100–120 V. Als Kammerpuffer diente TBE-Puffer mit 600 ng/ml EtBr.

Probenvorbereitung: 50–100 ng DNA + 5 µl 3 x Probenpuffer auf 15 µl mit H₂O aufgefüllt.

Die Identifizierung der DNA-Banden erfolgte mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm.

2.7.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die DNA-Bande unter UV Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm identifiziert, mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Isolierung erfolgte mittels Qiagen Spin Column Gel Extraction Kit. Die Lagerung der extrahierten DNA erfolgt bei –20°C.

2.7.5 Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

Eine dicht gewachsene ü. N.-Bakterienkultur (2 ml) wurde zur Isolierung von Plasmid-DNA in einem Eppendorfreaktionsgefäß sedimentiert (1 min, 14000 rpm, RT). Das Bakterienpellet

wurde in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und nach leichtem Schwenken 5 min bei RT inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 lysiert.

Zur Neutralisation der Suspension wurden 150 µl der Lösung 3 zugegeben, leicht geschüttelt, und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, RT) wurde der die DNA enthaltende Überstand abgenommen und zur Entfernung von Proteinverunreinigungen mit 1 VÄ Roti-Phenol versetzt, mit 1 VÄ Chloroform verdünnt, gemischt und zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (2 min, 14000 rpm, RT). Die DNA wurde mit 2,5 VÄ Ethanol gefällt (10 min, RT). Nach Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, RT) wurde das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 14000 rpm, RT). Anschließend wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in H₂O aufgenommen.

2.7.6 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Eine dicht gewachsene über Nacht-Bakterienkultur (100 ml) wurde in zwei 50 ml Röhrchen sedimentiert (20 min, 4500 rpm, 4°C). Die weitere Aufarbeitung wurde mit einem Midi/Maxi Plasmid/Cosmid Purification Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die in EB-Puffer aufgenommene DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.7.7 Amplifikation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. In 50 µl Ansätzen werden 10 ng DNA-Matrize, 30 pmol jedes Primers, 200 nmol dNTP-Mix und 0,5 U Pfu-Polymerase (Promega, Madison, USA) verwendet. Die Amplifikation der DNA im Thermocycler erfolgte durch „hot-start“ PCR in zwei Schritten, wobei fünf Zyklen mit 15 s bei 96°C, 30 s bei T_m-5°C und 60 s bei 72°C durchgeführt wurden und anschließend 20 Zyklen mit 15 s bei 96°C, 30 s bei T_m-5°C und 60 s bei 72 °C.

2.7.8 Restriktion von DNA

Um zu einer Abschätzung bezüglich der benötigten Einheiten an Restriktionsenzym pro µg DNA bei einer Inkubation von einer Stunde bei 37°C zu gelangen, wurde folgende Formel verwendet (1):

$$\frac{U}{\mu\text{g} \cdot \text{h}} = \frac{\text{bp (Standard)}}{\text{bp (Plasmid)}} \cdot \frac{\text{Restriktionsstellen (Plasmid)}}{\text{Restriktionsstellen (Standard)}} \quad (1)$$

mit: bp (Standard): aus Tabellenwerk (z. B. 48502 bp)
Restriktionsstellen (Standard): aus Tabellenwerk

Um die vollständige Restriktion der DNA sicherzustellen, wurde die oben genannte Enzymmenge generell verdoppelt. Der Restriktionspuffer hängt jeweils von der verwendeten Endonuklease ab. Zur Restriktion wurden jeweils 10 bzw. 30 μl Ansätze verwendet. Zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme wurden die Ansätze im Anschluss 10 min bei 65°C inkubiert.

2.7.9 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA wurde mit T4-DNA-Ligase durchgeführt. Ein Ligationsansatz von 20 μl enthält 50 ng des linearisierten Vektors und einen 2,5 moleq. Überschuss an gereinigtem PCR-Fragment. Außerdem wurden 0,5 U T4Ligase und 4 μl 5 x Ligasepuffer hinzugegeben und der Ansatz mit H₂O auf 20 μl aufgefüllt. Nach erfolgter Ligation von 2,5 h bei 37 °C wurde der Ansatz zur Inaktivierung der Ligase 20 min bei 65 °C inkubiert bevor er mit H₂O für die Elektroporation 1:1 verdünnt wurde.

2.7.10 Elektrotransformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Ein Aliquot (~ 80 μl) tiefgefrorener, elektrokompenter Zellen wurde kurz aufgetaut und in 20 μl des auf 0°C vorgekühlten Ligationsansatzes (Plasmidkonzentration etwa 25 ng/20 μl) überführt. Nach Mischen wurde die DNA/Bakteriensuspension ohne Luftblasen zu erzeugen in eine kalte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) pipettiert und mit 1,5 kV bei einem Widerstand von 800 Ω und einer Kapazität von 25 μF transformiert.

Anschließend wurde die Suspension sofort in 1 ml 2TY-Medium aufgenommen und in ein Reagenzglas überführt. Es wurde 1 h bei 37°C geschüttelt und jeweils 10 %, 1 % und 0,1 % der Bakteriensuspension auf 2TY-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden auf dem Deckel liegend im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.7.11 Sequenzierung von DNA

Die automatische Sequenzierung von DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mit Didesoxynukleotiden durchgeführt. Für einen 20 µl Ansatz zur PCR werden 450 ng Vektor und 30 pmol Primer verwendet. Es werden 4 µl 5 x Sequenzierungspuffer und 2 µl Sequenzierungsmix hinzugefügt und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt.

Ein typischer Sequenzierungs-PCR-Zyklus lautet:

Denaturierung: 10 s, 96°C
Hybridisierung: 5 s, bei einer Temperatur etwa 7°C unterhalb der T_m des Sequenzierungsprimers (50°C)
Polymerisation: 4 min, 60°C

Der Zyklus wurde 25 x wiederholt. Zur Reinigung des PCR-Ansatzes wurde der Ansatz mit 10 µl Fällungsreagenz (300 µl 3M NaOAc, 50 µl 100 mM EDTA, 650 µl H₂O), sowie mit 70 µl EtOH versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, RT, 14000 rpm) wurde mit 400 µl 70 % EtOH gewaschen und abermals zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet an der Luft getrocknet.

2.8 Proteinchemische Methoden

2.8.1 Expression und Reinigung der Ypt-Proteine

Für die Expression der Ypt-Proteine mit C-terminalen Mxe-Gyr-Intein und Chitin Bindungs-Domäne (CBD) wurden *E. coli* BL21(DE3)RIL Zellen verwendet, welche mit den rekombinanten Vektor pTWIN1 transformiert waren. Es wurde jeweils ein Liter autoklaviertes 2TY-Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit der über Nacht gewachsenen Vorkultur auf eine OD von ca. 0,06 angeimpft. Anschließend wurde die Expressionskultur bei 37°C bis zur mittleren logarithmischen Phase (OD₅₇₈ ~ 0,6) wachsen gelassen. Nachdem sie schlagartig gekühlt wurde, wurde die Expression des Proteins durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur bei 20°C ü. N. geschüttelt.

Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation isoliert (Rotor: SLA1500, 20 min, 4500 rpm, 4°C) und das Zellpellet in Aufschlusspuffer (0,3 M NaCl, 50 mM NaPi, pH 8,0)

resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte im Mikrofluidizer. Nach der Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation (Rotor: SS34, 30 min, 20000 rpm, 4°C) wurde der Überstand dekantiert und die löslichen Proteine erhalten.

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte mittels Chitinbeads. Das Säulenmaterial wurde mit fünf Säulenvolumen Waschpuffer (25 mM NaPi, 0,5 M NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 μM GDP, pH 7,5) equilibriert. Nach Auftragen des Überstands (Flussrate ~ 2 ml/min) wurden die Chitinbeads mit zehn Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen.

2.8.2 Generierung des C-terminalen α -Thioesters der Ypt-Proteine

Die Chitinbeads wurden mit zwei Teilen Mesna-enthaltenden Waschpuffer versetzt, so dass eine Mesna Gesamtkonzentration von 250 mM entstand. Diese Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 4°C leicht geschwenkt. Anschließend wurde die Lösung, welche das Protein mit C-terminalem Mesna-Thioester enthielt, eluiert. Das Säulenmaterial wurde danach mit fünf Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen.

Nach dem Spleißen des Mxe-Fusionsproteins wird die Protein-enthaltende Pufferlösung im Ultrafiltrationsröhrchen eingengt. Es wurden Amicon Ultra Centricons der Firma Millipore mit einem *cut off* von 10 kDa verwendet. Anschließend wurden die Proteine *via* Größenausschluss-Chromatographie mit einer Superdex 75-Säule von Amersham (*prep grade*) gereinigt. Nach Vereinigung Protein-enthaltender Fraktionen und Konzentration auf 1-5 mg/ml wurden die Proteine mittels LC-MS und SDS-PAGE analysiert.

2.8.3 *Southernblot* zum Nachweis von Protein-DNA-Konjugaten

Zum Nachweis der Bildung von Protein-DNA-Konjugaten wurde ein *Southernblot* durchgeführt. Dazu wurde eine SDS-PAGE der Ligationskontrolle durchgeführt und die Proteine auf Nitrozellulose (Schleicher & Schuell, Dassel/Germany) transferiert. Anschließend wurde die Zellulosemembran 45 min mit 5 % Magermilchpulver in PBS-Puffer blockiert. Danach wurde sie drei mal 5 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen. Über Nacht wurde die Membran dann mit einer 2,5 μM Oligonukleotidlösung inkubiert. Dabei wurde jeweils 5'-Biotin-markiertes zum Analyten komplementäres Oligonukleotid verwendet, welches nun mit der DNA des Protein-DNA-Konjugates hybridisierte.

Als nächstes wurde die Membran erneut drei mal 5 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen. Daraufhin wurde sie 30 Minuten mit einem Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat (20

μl in 10 ml PBS-Puffer, 0,1 % (v/v) Tween20) (Sigma, Steinheim) inkubiert. Nach weiteren drei 5 minütigen Waschgängen mit PBS-Puffer wurde die Membran mit 10 ml H_2O , in denen eine Tablette des NBT/BCIP-Reagenzes (Roche, Mannheim) aufgelöst war entwickelt. Das Konjugat lässt sich als blau-violette Bande auf der Nitrozellulosemembran detektieren.

2.8.4 Expression der menschlichen TMPK

Für die Expression der menschlichen TMPK31-212 Mutante [R200A] wurden *E. coli* (DE3)RIL-Zellen verwendet, die mit einem modifizierten pTXB-1 Vektor transformiert waren, welcher die TMPK mit einem N-terminalen His₆-Tag und der *tobacco etch virus* (Tev)-Protease Erkennungssequenz (ENLYFQ) codierte.

Dazu wurde eine über Nacht dicht gewachsene Vorkultur mit 2TY-Medium, welches Ampicilin (100 mg/l) und Chloramphenicol (30 mg/l) enthielt, auf eine OD₅₇₈ von 0,06 verdünnt. Die Zellen wurden bei 37°C und 130 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6 herangezogen und dann mit 1 mM IPTG induziert. Nach 2 Stunden Expression wurden die Zellen durch Sedimentation (Rotor: SLA1500, 20 min, 4500 rpm, 4°C) isoliert und in Aufschlusspuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4) resuspendiert. Nach erfolgtem Aufschluss im Mikrofluidizer wurden die Zelltrümmer und Membranbestandteile 25 min bei 20000 rpm (Rotor: SS34) und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit Aufschlusspuffer, welcher 0,5 % (v/v) Triton enthielt, gewaschen und erneut sedimentiert. Nach einem weiteren Waschgang mit Aufschlusspuffer ohne Triton und Sedimentation wurde das Pellet in 8 M Gdn·HCl, 50 mM Tris pH 8,0 über Nacht bei Raumtemperatur solubilisiert. Zur Reinigung des Konstruktes wurde Ni-NTA-Affinitätschromatographie herangezogen. Dazu wurde das Säulenmaterial mit 10 SV Solubilisierungspuffer equilibriert und im Anschluss die solubilisierete TMPK bei einem Fluss von ca. 2 ml/min aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 10 SV Waschpuffer (6 M Gdn·HCl, 20 mM Imidazol, 50 mM Tris pH 8,0) wurde das Protein mit 5 SV Eluierungspuffer (6 M Gdn·HCl, 250 mM Imidazol, 50 mM Tris pH 8,0) von der Säule eluiert. Die Produkt-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, mithilfe von Ultrafiltrationsröhrchen konzentriert und per HPLC und ESI-MS analysiert.

2.8.5 Tev-Verdau des DNAK(1-18)His₆-(ENLYFQ)-TMPK31-212-Konstruktes

Um das DNAK-Fragment und den His-Tag von der TMPK zu entfernen und gleichzeitig ein N-terminales Cystein für die nachfolgende native chemische Ligation zu generieren wurde die

TMPK 6 h bei RT gegen einen Harnstoffpuffer (4 M Harnstoff, 0,5 mM EDTA, 5 mM Mesna, 50 mM Tris pH 8,0) dialysiert. Nach Zugabe der Tev-Protease (1:50 (w/w)) wurde die Harnstoffkonzentration über Nacht bei RT durch Dialyse (1,9 M Harnstoff, 0,5 mM EDTA, 5 mM Mesna, 50 mM Tris pH 8,0) reduziert. Das entstandene Präzipitat, welches das Fragment TMPK31-212 enthielt, wurde durch inverse Ni-NTA gereinigt. Produktenthaltende Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und mittels HPLC und ESI-MS analysiert.

2.8.6 Rückfaltung der TMPK1-212

Die TMPK1-212 wurde in ihre native Form überführt indem sie in Chaotrop-enthaltenden Puffer (6 M Gdn·HCl, 50 mM Tris, pH 8,0) gelöst und anschließend bei 4°C gegen Chaotrop-freien Puffer (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,1 mM ATP, 0,1 mM TMP, 50 mM Tris pH 7,5) schrittweise dialysiert wurde. Dabei betrug die Konzentration des Proteins 0,1 mg/ml. Die Aktivität des Enzyms wurde im Anschluss daran durch einen gekoppelten Enzymtest bestimmt.

2.8.7 Cy5-Markierung von DSS4

Zur Markierung des DSS4 mit Cy5 wurde das Cy5 Mono-reactive Dye pack von Amersham Biosciences verwendet. Dazu werden 1 mg DSS4 auf ein Aliquot des *kit* gegeben und 1,5 h bei RT geschwenkt. Danach wurde das markierte Protein mittels Nap5-Säule nach Herstellerangaben von nicht reagierten Cy5 abgetrennt.

2.8.8 Reinigung der Protein-DNA-Konjugate

Zur Reinigung der Protein-DNA-Konjugate wurde die Größenausschlusschromatographie herangezogen. Dazu wurden jeweils 15 µl der Ligationmischung auf die Gelfiltrationssäule (S2000 analytisch, Phenomenex) aufgetragen. Die Aufreinigung verlief dabei isokratisch (500 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 µM GDP, 50 mM Tris pH 7,5) 30 min lang bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (Silberfärbung) analysiert, Produkt-enthaltene Fraktionen vereinigt und mittels Ultrafiltrationsröhrchen konzentriert.

2.8.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie Blue G-250 verschiebt sich bei Bindung an ein Protein mit positiven Seitenketten von 465 nm nach 595 nm. Es wurde 1 µl der zu untersuchenden Probe mit 99 µl Wasser verdünnt und anschließend mit dem Bradfordreagenz (AppliChem, Darmstadt) auf 1 ml aufgefüllt. Die Messung der Absorption erfolgte nach 10 min. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte an Hand einer Eichgeraden mit dem Standard BSA (Roth).

2.8.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Proteinauftrennung

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Lämmli (1970). Die Proteine wurden mittels elektrophoretischer Trennung in SDS-Polyacrylamidgelen bei einer konstanten Stromstärke von 45 mA etwa 35 min aufgetrennt. Die Ansätze für jeweils ein Gel sind in der Tabelle 2.6 angegeben.

Tabelle 2.6: Pipettierschema für ein Lämmli Gel

	Trenngel 15 %	Sammelgel 4 %
Acrylamid 30 %	3,75 ml	0,45 ml
Wasser	1,8 ml	1,8 ml
Trenngelpuffer	1,95 ml	-
Sammelgelpuffer	-	0,35 ml
SDS 10 % (w/v)	79 µl	27 µl
APS 10 % (w/v)	79 µl	27 µl
TEMED	2,3 µl	2,6 µl

Nach Zugabe von TEMED wurde der Ansatz kurz gemischt und das Gel sofort gegossen. Das Trenngel wurde ca. 1 cm unter dem Probentaschenkamm gegossen und mit Ethanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Ethanol entfernt und das Sammelgel darüber gegossen. Probenvorbereitung: max. 5 µg Protein enthaltene Lösung eins zu eins mit 2 x SDS-Probenpuffer mischen.

Zur Abtrennung von störenden Salzen wurden die Proteine bei 0°C mit 10% TCA gefällt. Das Präzipitat wurde zwei mal mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in SDS-

Probenpuffer aufgenommen. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele mit dem Farbstoff Coomassie gefärbt. Der nicht an die aufgetragenen Proteine gebundene Farbstoff wurde mit Entfärbelösung entfernt.

2.8.11 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde nach dem Verfahren von Schumacher *et al.* (1983) durchgeführt. Zuerst wurde das SDS-Gel 30 Minuten lang in der Fixierlösung geschüttelt. Anschließend zehn Minuten in der Inkubationslösung. Danach wurde das Gel drei mal je fünf Minuten lang mit Wasser gewaschen. Dann wurde es zehn Minuten lang der Silbernitratlösung ausgesetzt, gefolgt von drei weiteren Waschgängen mit Wasser, wobei jeder Waschgang 20 Sekunden nicht überschreiten sollte, da sonst das Silbernitrat wieder ausgewaschen wird. Danach wurde das Gel so lange in die Entwicklerlösung gelegt, bis die Banden ausreichend gefärbt waren. Zuletzt wurde die Entwicklerlösung entfernt und die Stopplösung über das Gel gegeben um eine weitere Färbung des Gels zu verhindern.

2.9 Biophysikalische Methoden

2.9.1 Analytik der Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden per MALDI-TOF-Spektrometrie untersucht. Als Matrixsubstanz wurde 3-Hydroxy-Pikolinsäure verwendet. Für die Messung wurden jeweils 0,5 µl der Probe und der Matrixlösung im Verhältnis 1:1 (v/v) miteinander gemischt und langsam trocknen gelassen.

2.9.2 CD-Spektroskopie

CD-Spektren wurden an einem J-710 Spektrometer von Jasco aufgenommen. Es wurde bei 25°C in einer Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm gemessen, wobei das Protein auf eine Endkonzentration von 4 µM mit Messpuffer (20 mM NaPi pH 8,0) verdünnt wurde. Die Spektren wurden um die Pufferbeiträge korrigiert.

2.9.3 Gekoppelter, UV-spektroskopischer Enzymtest zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{cat} der TMPK

Zur Bestimmung der Aktivität der TMPK wurde ein von Reinstein *et al.* (1988) für die Adenylatkinase optimierter gekoppelter Enzymtest verwendet, der auf dem Test von Berghäuser (1975) basiert. Die Grundlage des Tests ist eine Abnahme der UV-Absorption von NADH bei der Oxidation zu NAD bei einer Wellenlänge von 340 nm. Voraussetzung für den Test ist, dass beide dem Test zugrunde liegenden katalysierten Reaktionen der Pyruvatkinase (PK) und der Lactatdehydrogenase (LDH) um einige Größenordnungen schneller sind, als die untersuchte Enzymreaktion.

Alle Messungen wurden in 1 ml Gesamtvolumen bei 20°C an einem Ultraspec 2100 pro UV-Spektrophotometer von Amersham Biosciences durchgeführt. Der verwendete Puffer bestand aus 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,2 mM NADH, 0,4 mM PEP und 50 mM Tris pH 7,5. Für die Messung wurden 10 µl eines 2:5-Gemisches aus LDH und PK mit einer Konzentration von 10 mg/ml hinzugegeben und eine TMP-Konzentration von 0,5 mM und eine TMPK Konzentration von 150 nM eingestellt. Vor der Zugabe des ATP, bis zu einer Endkonzentration von 1 mM wurde jeweils kontrolliert, ob die UV-Absorption konstant ist.

2.9.4 Fluoreszenz-basierte Mikroarray-Experimente

2.9.4.1 Hybridisierung von Protein-DNA-Konjugaten

Die Oberfläche der DNA-Mikroarrays wurde zunächst mit Blockpuffer (500 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 µM GDP, 5 % Magermilchpulver, 0,1 % Tween20, 50 mM Tris pH 7,5) 30 min bei RT blockiert, um unspezifische Bindung an die Oberfläche zu verhindern.

Im Anschluss daran, wurde der DNA-Chip 6 h bei RT mit der Protein-DNA-Konjugat-enthaltenden Lösung inkubiert. Nach Waschen mit Ypt-Puffer (500 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 µM GDP, 50 mM Tris pH 7,5), konnte der DNA-Chip entweder weiterverwendet, oder mit H₂O gewaschen, getrocknet und im Fluoreszenzscanner ausgelesen werden.

2.9.4.2 Nukleotidaustausch an den immobilisierten Ypt-Proteinen

Der DNA-Chip mit den nach Abschnitt 2.9.4.1 immobilisierten Protein-DNA-Konjugaten wurde mit Nukleotid-freien, EDTA enthaltenden Ypt-Puffer gewaschen (500 mM NaCl, 2

mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7,5) und anschließend mit Fluoreszenzmarker gelabelten GTP (EDA-GTP-ATTO-Atto 633 Jena Bioscience) (10 µM) 2 h bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschgang mit Ypt-Puffer mit 2-fachem Überschuss an Magnesium über EDTA (500 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7,5) wurde der Chip entweder weiterverwendet oder mit H₂O gewaschen, getrocknet und im Fluoreszenzscanner ausgelesen.

2.9.4.3 GTP-ATTO-Verdrängung an Ypt1Δ2C-Oligonukleotid-A durch DSS4-Bindung

Zuerst wurde der DNA-Chip mit Ypt1Δ2C-Oligonukleotid-A, wie in Abschnitt 2.9.4.1 beschrieben, inkubiert und danach der GDP/GTP-ATTO-Austausch, wie in Abschnitt 2.9.4.2 beschrieben, durchgeführt. Im Anschluss daran wurde der DNA-Chip mit DSS4-Puffer (100 mM NaCl, 2 mM BME, 10% (v/v) Glycerin, 10 µM ZnCl₂, 50 mM Tris pH 8,0) gewaschen und dann 1 h mit DSS4 (80 µl, 10 µM) inkubiert. Nach erneuten Waschgängen erst mit DSS4-Puffer, dann mit H₂O wurde der Chip getrocknet und im Fluoreszenzscanner ausgelesen.

2.9.4.4 Cy5-DSS4-Bindung an Ypt1Δ2C-Oligonukleotid-A

Nachdem das Protein-DNA-Konjugat, wie in Abschnitt 2.9.4.1 beschrieben, auf dem DNA-Chip immobilisiert wurde, wurde zuerst mit Ypt-Puffer ohne Nukleotid und dann mit DSS4-Puffer gewaschen. Danach wurde der DNA-Chip 30 min bei RT mit Cy5-DSS4 (80 µl, 1 µM) inkubiert und erneut mit DSS4-Puffer und dann mit H₂O gewaschen. Nach dem Trocknen wird der Chip im Fluoreszenzscanner ausgelesen.

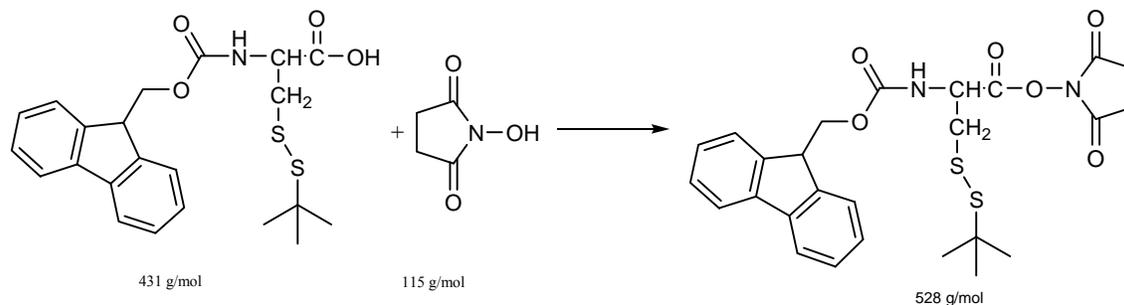
2.9.5 MALDI-TOF-Analyse eines Ypt-Bindungspartners

Die Immobilisierung des Protein-DNA-Konjugates auf dem DNA-Chip wurde, wie in Abschnitt 2.9.4.1 beschrieben, vorgenommen und der Nukleotidaustausch, wie in Abschnitt 2.9.4.2 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde der DNA-Chip mit der Analytenthaltenden Lösung eine Stunde inkubiert. Danach wurde er mit H₂O gewaschen und luftgetrocknet.

Für die anschließende MALDI-Messung wurden pro Array 2 µl Matrix (9,5 mg/ml in Aceton für Spektroskopie (Merck)) aufgetragen. Die Messung erfolgte im linear/positiv-Modus.

2.10 Chemische Methoden

2.10.1 Synthese von N-Fmoc-L-Cystein(S-*t*-Butylthio)-O-NHS



Zur Aktivierung des N-Fmoc-L-Cystein(S-*t*-Butylthio)-OH werden 250 mg (0,58 mmol) der Aminosäure, sowie 73,2 mg (0,64 mmol, 1,1 eq.) N-Hydroxysuccinimid in 10 ml THF gelöst. Diese Lösung wird auf 0°C abgekühlt und anschließend 131 mg (0,64 mmol, 1,1 eq.) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wird ü. N. bei 0°C → RT gerührt. Danach wird das DCC abfiltriert und das Reaktionsprodukt im Vakuum getrocknet. Die Reaktion verläuft quantitativ und wird mittels NMR-Spektroskopie und ESI-MS charakterisiert.

Ausbeute: 303 mg (0,57 mmol) entsprechen 99 %

Formel: Mw 528,6 g/mol

ESI-MS: $[m+Na]^+$ 551,3

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.76 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.40 (dt, $J=0.6/7.4/7.5$ Hz, 1H), 7.32 (dt, $J=1.1/7.5/7.5$ Hz, 1H), 5.07 (dt, $J=4.3/7.9/7.8$ Hz, 1H), 4.43 (m, 1H), 4.27 (t, $J=7.1/7.1$ Hz, 1H), 3.36 (dd, $J=3.8/14.0$ Hz, 1H), 3.18 (dd, $J=7.7/14.2$ Hz, 1H), 2.84 (s, 1H), 1.36 (s, 1H)

2.10.2 Kopplung des N-Fmoc-L-Cystein(S-*t*-Butylthio)-O-NHS an das Oligonukleotid

Zur Cystein-Modifikation der 5'-Amino-funktionalisierten Oligonukleotide wurde eine 100 μM Oligonukleotidlösung in PBS hergestellt. Diese wurde 1:1 (v/v) mit einer 10 mM Lösung des N-Fmoc-L-Cystein(S-*t*-Butylthio)-O-NHS (100 eq.) in DMF vermischt. Die entstandene Reaktionslösung wurde bei RT ü. N. leicht geschwenkt.

Anschließend wurde sie an der Speedvac zur Trockne eingengt, in 500 µl H₂O aufgenommen und das nicht reagierte Cystein erst über eine Nap5-Säule, dann über eine Pd10-Säule nach Herstellerangaben abgetrennt.

Die entstandene wässrige Lösung wurde erneut an der Speedvac getrocknet und dann die Fmoc-Gruppe am Cystein abgespalten. Dazu wurde das Oligonukleotid in 300 µl 10 % NH₃ in MeNH₂ aufgenommen und zuerst 20 min bei RT, anschließend 15 min bei 65°C inkubiert. Nach erneutem Trocknen an der Speedvac wurde das Oligonukleotid in 500 µl H₂O aufgenommen und das entstandene Benzofulven mithilfe einer Nap5-Säule nach Herstellerangaben abgetrennt.

Das Produkt wurde anschließend mittels *reversed phase* Chromatographie über eine C18-Säule gereinigt. Dazu wurde ein Gradient von 5 % Puffer B in Puffer A hin zu 100 % Puffer B in Puffer A über 30 min verwendet. Die Produkt-enthaltende Fraktion wurde an der Speedvac getrocknet und über MALDI-MS charakterisiert.

2.10.3 Native chemische Ligation der Ypt-Proteine mit dem Peptid H-CGK_(NBD)GHHHHHH-OH

Als ein Test für die Fähigkeit der Ypt-Proteine chemische native Ligationen einzugehen wurden sie mit dem Testpeptid H-CGK_(NBD)GHHHHHH-OH ligiert, welches ein N-terminales Cystein trug. Dazu wurden 50 µg des Proteins in einem Gesamtvolumen von 50 µl (40 µM) (500 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 25 mM NaPi pH 7,5) mit 5 eq. des Peptids und 2 % (v/v) Thiophenol versetzt. Die Ligation verlief bei RT über Nacht und wurde anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert. Im Falle einer Ligation unter denaturierenden Bedingungen wurde ein Chaotrop-enthaltender Puffer gewählt (6 M Gdn·HCl, 50 mM Tris pH 8,0).

2.10.4 Native chemische Ligation der Ypt-Proteine mit den Cystein-modifizierten Oligonukleotiden

Die Ypt-Proteine, welche über einen C-terminalen Mesna-Thiester verfügen, wurden mit den 5'-Cystein-modifizierten Oligonukleotiden über die chemische native Ligation verknüpft. Dazu wurde eine ca. 150 µM Proteinlösung (500 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 µM GDP, 50 mM Tris pH 8,3) mit 5 moleq. des Cystein-modifizierten Oligonukleotids versetzt. Als

Ligationsvermittler dienten 250 mM Mesna und 4 % (v/v) Ethanthiol. Die Ligationsdauer betrug zwei Tage bei 4°C. Die Ligation wurde anschließend mittels SDS-PAGE kontrolliert.

2.10.5 Festphasensynthese von Peptiden

Die in dieser Arbeit synthetisierten Peptide wurden durch manuelle Festphasensynthese hergestellt (Merrifield 1963), wobei das *in situ* Neutralisations- und Aktivierungsprotokoll für die Boc-Schutzgruppenchemie von Schnölzer *et al.* (1992) verwendet wurde. Es wurden für die Synthese der Peptide spezielle Thioester-Harze verwendet, welche bei der Abspaltung des Peptids einen C-terminalen α -Thioester generieren, der für die chemische native Ligation notwendig ist (Hackeng *et al.* 1997).

Die reaktiven Seitenketten der für die Peptidsynthese verwendeten Boc-Aminosäuren waren mit den folgenden Gruppen geschützt: Arg(Tos), Asn(Xan), Ser(Bzl), Glu(OcHx), Lys(2-CL-Z), Thr(Bzl), Tyr(2-Br-Z). Die Seitenketten aller nicht aufgeführten Aminosäuren waren ungeschützt.

Die manuellen Synthesen wurden in Maßstäben von 0,1 bis 0,2 mmol durchgeführt. Für die Reaktion wurden dabei Glasgefäße mit Fritte (Porengröße 3 oder 4) und Vakuumananschluss verwendet.

Boc-Chemie:

Die Polymerharze wurden mindestens 20 min in DMF gequollen. Die N-terminale Boc-Gruppe der ersten Aminosäure wurde durch Behandeln mit 100 % TFA (zweimal 1 min) abgespalten. Das TFA wurde durch einen einminütigen *flow wash* mit DMF entfernt. Im 0,2 mmol-Maßstab wurden 2 mmol der zu koppelnden Boc-geschützten Aminosäure in 3,8 ml einer 0,5 M HBTU-Lösung (1,9 mmol) in DMF und 1 ml DIEA 3 min aktiviert. Das Harz wurde dann in dieser Lösung für 12 min inkubiert. Bei nicht vollständiger Kopplung wurde die Prozedur wiederholt. Danach wurde erneut 1 min mit DMF gewaschen. Alle Kopplungsschritte wurden nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Vor und nach der Kopplung von Gln wurde mit DCM gewaschen. Vor der Kopplung der ersten Aminosäure wurde die Thiolschutzgruppe des Linkers mit einer Lösung aus 3,1 ml Piperidin, 2,3 ml β -Mercaptoethanol und 10 ml DMF 20 min bei RT abgespalten. Anschließend wurde 1 min mit DMF gewaschen. Zur Überprüfung der Entschützungs- und Kopplungseffizienz wurden Kaiser-Tests durchgeführt (Sarin *et al.* 1981).

Abspaltung des Peptids vom Harz:

Die N-terminale Boc-Gruppe wurde entsprechend der Entschützungsreaktion bei der Kettenverlängerung abgespalten. Vor der Abspaltung wurde das Harz mit DCM gewaschen und unter reduziertem Druck getrocknet. Zur Abspaltung der synthetisierten Peptide wurden diese 1 h bei 0°C mit 10 ml wasserfreiem HF und 500 µl p-Kresol behandelt. Das HF wurde danach unter reduziertem Druck bei 0°C entfernt. Das Rohpeptid wurde in Diethylether präzipitiert und die entstandene Suspension abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Anschließend wurde das Rohpeptid in einem Gemisch aus 50 % Puffer D (Acetonitril, 0,08% (v/v) TFA) in Puffer C (H₂O, 0,1% (v/v) TFA) gelöst und lyophilisiert.

Reinigung der Peptide:

Die Reinigung des Rohpeptids erfolgte im analytischen Maßstab durch RP-HPLC mit einer C4-Säule der Abmessung 125 x 4 mm und im präparativen Maßstab durch RP-HPLC mit einer C4-Säule der Abmessung 250 x 10 mm bzw. 250 x 22 mm bei Flussraten von 1-10 ml/min. Zur Aufreinigung wurde das Peptid in 50 % (v/v) Puffer C (Wasser + 0,1 % (v/v) TFA) und 50% (v/v) Puffer D (Acetonitril + 0,08% (v/v) TFA) aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Die Elution des Peptids wurde durch verschiedene, dem Produkt angepasste, Gradienten durchgeführt. Die Produkt-enthaltenden Fraktionen wurden durch ESI-MS charakterisiert, vereinigt und lyophilisiert.

3. Ergebnisse

3.1 Strategie zur Immobilisierung der Ypt-Familie auf einer festen Oberfläche

Die Immobilisierung von Proteinen an Oberflächen ist eine anspruchsvolle Aufgabe. So darf das Protein durch die Immobilisierung nicht seine native Faltung ganz oder teilweise verlieren. Auch muss beachtet werden, dass der Zugang zu Bindungsflächen, Bindungstaschen, oder einem aktiven Zentrum des Proteins frei liegen muss, und nicht durch die Oberfläche oder eine zu hohe Beladung der Oberfläche mit dem Protein blockiert ist.

Es gibt grundsätzlich vier verschiedene Ansätze zur Immobilisierung von Proteinen an Oberflächen. Dabei ist das Protein entweder kovalent oder nicht kovalent, spezifisch oder unspezifisch gebunden.

Ein Beispiel für eine kovalente aber unspezifische Bindung ist die Bindung des Proteins über Aminogruppen an eine Aldehyd-funktionalisierte Oberfläche (MacBeath *et al.* 2000). Dabei bindet das Protein über seinen N-Terminus oder Lysin-Seitenketten. Allerdings ist das Protein dadurch auf der Oberfläche statistisch orientiert. Außerdem kann durch die Nähe zur Oberfläche eine Teildenaturierung erfolgen.

Um hochspezifisch und gleichzeitig kovalent an eine Oberfläche zu binden muss das Protein über bioorthogonale Reaktionen gekoppelt werden. Beispiele dafür sind die Staudingerligation (Watzke *et al.* 2006) oder die *Click*-Chemie (Duckworth *et al.* 2006). Allerdings muss hierfür im Gegensatz zur unspezifischen Immobilisierung immer eine reaktive Gruppe in das Protein eingefügt werden, was einen synthetischen Aufwand erfordert. In dieser Arbeit wurde ein nicht kovalenter jedoch hochspezifischer Ansatz gewählt. Auch hier gibt es mehrere verschiedene Möglichkeiten. So kann beispielsweise ein Protein mit einem Hexahistidintag (His₆) an eine mit Ni-NTA beschichtete Oberfläche gebunden werden (Zhu *et al.* 2001).

Die Immobilisierung über DNA (DDI) bietet allerdings viele Vorteile. Hierbei wird das zu immobilisierende Protein kovalent mit einem kurzen DNA-Einzelstrang von 10–30 Basenpaaren verknüpft (Becker *et al.* 2005). Das so gebildete Protein-DNA-Konjugat kann über Hybridisierung mit einer komplementären DNA-Sequenz, welche mit der Oberfläche verknüpft ist, immobilisiert werden. Dabei können die Erfahrungen aus der DNA-Mikroarray-Technologie in vollem Umfang genutzt werden. Die Immobilisierung ist reversibel und der DNA-Chip kann theoretisch beliebig oft wieder verwendet werden (Benters *et al.* 2001).

Außerdem fungiert das Oligonukleotid, wie ein weiterer Linker, und vergrößert den Abstand zur Oberfläche noch weiter.

Ein eingesetztes Protein-DNA-Konjugat bindet nur an seine spezifische Sequenz, daher ist die Immobilisierung adressiert und das Protein muss nicht durch *Mikrospotting* oder *Inkjetting* auf dem Array aufgetragen werden. Wenn es in einer Lösung über dem Array vorliegt findet es seine Bindungsstellen selbst.

Ein weiterer Vorteil der DDI zur Immobilisierung von Proteinen ist eine gleichmäßige Orientierung des Proteins. So können zum Beispiel die für die Aktivität des Proteins wichtigen Bereiche oder Bindungsflächen in die Lösung hineinragen.

Um all diese Vorteile der DDI nutzen zu können, erfordert es Techniken das Protein mit der DNA zu verknüpfen. So gibt es zum Beispiel die Möglichkeit Maleinimid-funktionalisierte Oligonukleotide über Cystein-Seitenketten an das Protein zu binden (Kukolka und Niemeyer 2004), oder Succinimid-funktionalisierte Oligonukleotide über Lysin-Seitenketten zu binden (Glynnou *et al.* 2003). Damit allerdings die Regioselektivität, Stöchiometrie und Orientierung des Proteins auf der Oberfläche kontrolliert werden können braucht es eine ortspezifische Kopplung des Oligonukleotids.

In dieser Arbeit wurde einem Ansatz von Lovrinovic und Niemeyer (2005) gefolgt. Dieser ist im ersten Teil der Strategie (Abb. 3.1) abgebildet. Dabei wird auf ein 5'-Amino-funktionalisiertes Oligonukleotid ein Cystein gekoppelt. Dieses kann dann ortspezifisch und bioorthogonal durch die *expressed protein ligation* (EPL) (Muir *et al.* 1998) C-terminal mit einem Protein verknüpft werden. Das entsprechende Protein muss dazu über einen C-terminalen α -Thioester verfügen. Dieser wird mittels Spleißen über die Intein-Technologie erhalten.

Im Falle der Ypt-Protein-Familie bietet diese DNA-Markierung noch einen weiteren Vorteil. Die Ypt-Proteine besitzen einen langen flexiblen C-Terminus, über den sie mithilfe eines Lipidankers an Membranen assoziieren können. Diese Eigenschaft der Ypt-Proteine kann bei der Immobilisierung an Oberflächen genutzt werden. Die Wahrscheinlichkeit der Erhaltung der nativen Form der Proteine wird weiter erhöht und die Zugänglichkeit der Bindungstasche wird gewährleistet.

Damit Effektorproteine binden können, müssen die Ypt-Proteine in ihrer aktiven Form vorliegen. Um das zu erreichen muss ein GDP-GTP-Austausch durchgeführt werden. Dieser soll nicht vor der Ligation mit dem Oligonukleotid vorgenommen werden, sondern nach erfolgter Ligation und Immobilisierung auf der festen Oberfläche.

3. Ergebnisse

Zur Detektion möglicher Bindungspartner der Ypt-Proteine wird ein massenspektrometrischer Ansatz mittels MALDI-TOF gewählt. Er bietet mehrere Vorteile: Zum einen muss für diesen Ansatz ein Bindungspartner nicht vorher markiert werden, wie es zum Beispiel für Fluoreszenz oder Isotopenmarkierung der Fall ist. Zum anderen werden über den Bindungspartner mit seiner Masse mehr Informationen erhalten, als nur ein bloßes Ja oder Nein über die Bindung, wie es zum Beispiel bei der Fluoreszenz der Fall ist. Und zuletzt könnte ein gefundener Bindungspartner über spezielle MALDI-MS/MS-Techniken sequenziert und damit identifiziert werden.

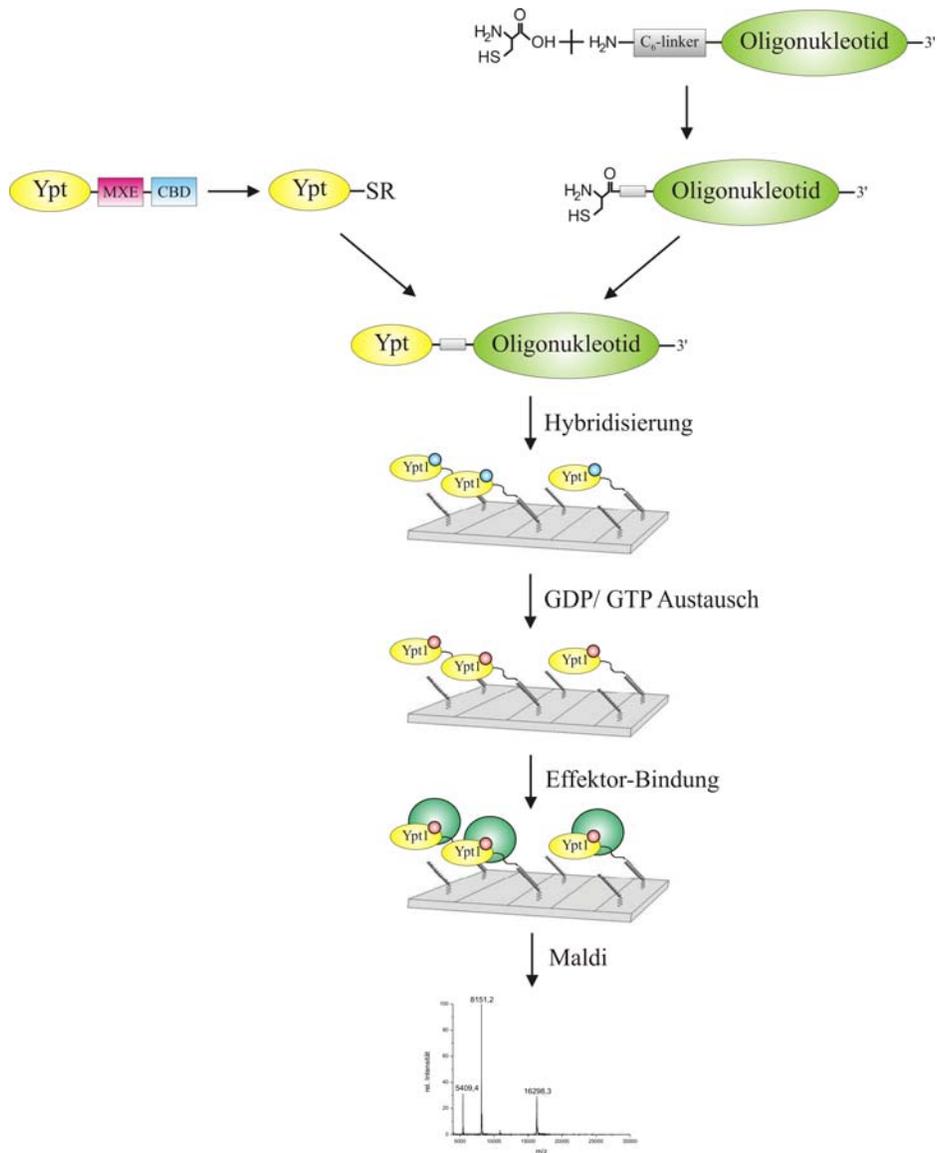


Abb. 3.1: Strategie und Syntheschema zur Immobilisierung der Ypt-Protein-Familie auf einem festen Träger und Detektion möglicher Bindungspartner.

3.2 Synthese und Aufreinigung der Cystein-modifizierten Oligonukleotide

3.2.1 Aktivierung des N-Fmoc-L-Cystein(S-*t*-Butylthio)-OH

Zur Kopplung des Cysteins an die 5'-Amino-funktionalisierten Oligonukleotide wurde ein N-Fmoc-geschützter Baustein verwendet. Die Seitenkette des Cysteins war dabei mit einer S-*t*-Butylthio-Schutzgruppe geschützt. Während der Ligation konnte diese durch die reduktiven Bedingungen *in situ* abgespalten werden und damit die Sulfhydryl-Gruppe freigeben. Zur Aktivierung der Carboxygruppe wurde ein NHS-Ester gewählt, weil dieser hydrolysestabil und daher ausreichend lagerstabil ist (Yam *et al.* 2006).

Die Reaktion wurde in THF mit einem leichten Überschuss an N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Entfernen des entstandenen Harnstoff-Derivates und des Lösungsmittels durch Filtration und Trocknung im Vakuum wurde das aktivierte N-Fmoc-L-Cystein(S-*t*-Butylthio)-O-NHS in quantitativer Ausbeute erhalten.

Zur Analyse wurde ein $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 aufgenommen (Abschnitt 2.10.1). Außerdem wurde eine kleine Menge der aktivierten Aminosäure in Acetonitril/Wasser 70:30 mit 0,1 % TFA gelöst und ein ESI-MS gemessen. Das erhaltene Spektrum ist in Abbildung 3.2 gezeigt. Es ist ein einzelnes Signal mit einer Masse von 551,3 m/z zu sehen, welche mit der berechneten Masse des Na-Addukts $[\text{M}+\text{Na}]^+$ der Aminosäure von 551 g/mol sehr gut übereinstimmt.

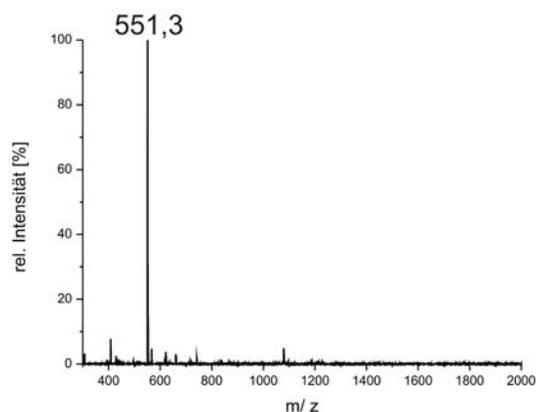


Abb. 3.2: ESI-MS des aktivierten N-Fmoc-L-Cystein(S-*t*-Butylthio)-O-NHS. Es ist ein einzelnes Signal von 551,3 m/z zu sehen, welche mit dem Na-Addukt der Aminosäure von 551 g/mol sehr gut übereinstimmt.

3.2.2 Cystein-Modifizierung der Oligonukleotide

5'-C6-Aminolink-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'

M = 7749 g/mol

Die Cystein-Modifizierung der 5'-Amino-funktionalisierten Oligonukleotide ist im Folgenden am Beispiel des Oligonukleotids A dargestellt. Die Reaktion wurde in Lösung vorgenommen. Dazu wurde das vollständig entschütztes Oligonukleotid in einem 50:50 Gemisch aus PBS-Puffer und Dimethylformamid (DMF) bei Raumtemperatur mit 100 moleq. des aktivierten N-Fmoc-L-Cystein(S-*t*-Butylthio)-O-NHS umgesetzt.

Das im hohen Überschuss vorliegende, nicht umgesetzte Cystein wurde mittels Nap5- und PD10-Säule entfernt und das Oligonukleotid in der Speedvac getrocknet. Nach dem Lösen des Oligonukleotids in H₂O wurde die Reaktion durch MALDI-MS analysiert. Dabei wurde als Matrix 3-HPA verwendet und das Spektrum im Negativ-Modus aufgenommen. Das Spektrum ist in der Abbildung 3.3 (links) zu sehen. Dort wird eine einzelne Masse von 7978 m/z detektiert, welche gut mit der berechneten Masse des N-Fmoc-L-Cystein(S-*t*-Butylthio)-Oligonukleotid-A von 7972 g/mol übereinstimmt. Die Differenz von 6 Da beruht dabei auf unzureichende Kalibrierung des Massen-Spektrometers.

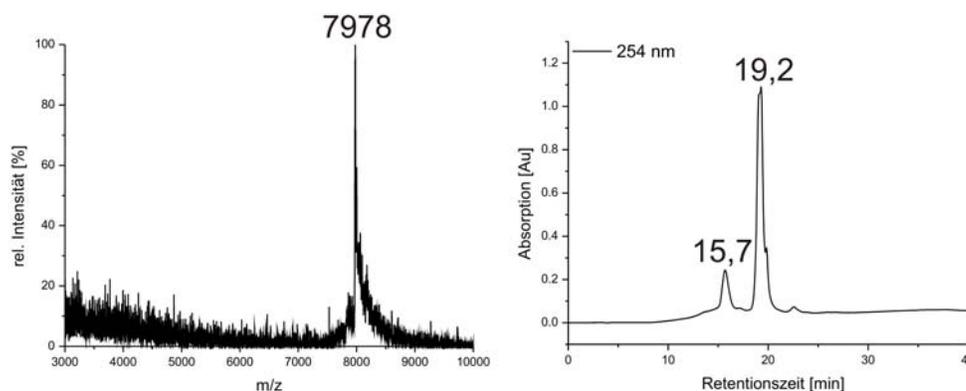


Abb. 3.3: MALDI-MS der Reaktionsmischung (links). HPLC-Chromatogramm (rechts) der Reaktionsmischung nach Fmoc-Entschützung. Es wurde eine analytische RP-C18-Säule verwendet. Der Gradient ging dabei von 5 % B in A zu 100 % B über 30 min. Edukt: 15,7 min Produkt L-Cystein(S-*t*-Butylthio)-Oligonukleotid-A: 19,2 min.

Im Anschluss wurde die Fmoc-Gruppe durch Behandlung mit 10 % NH₃ in Methylamin bei 65°C abgespalten und mit Hilfe einer Nap5-Säule das entstandene Benzofulven und seine

3. Ergebnisse

Additionsprodukte abgetrennt. Nach erneutem Trocknen in der Speedvac und Aufnahme in H₂O wurde das entstandene Produkt durch RP-HPLC analysiert. Dabei wurden die Triethylammonium-Acetat-enthaltenden HPLC-Puffer A und B verwendet, wobei der Gradient von 5 % B in A über 30 min bis hin zu 100 % B verlief und eine analytische C18-Säule bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet wurde. Im HPLC-Chromatogramm (Abb. 3.3 rechts) sind zwei Signale zu sehen. Das erste Signal bei 15,7 min entspricht dabei dem Edukt der Reaktion (unmodifiziertes Oligonukleotid A), das zweite Signal bei 19,2 min entspricht dem Produkt L-Cystein(S-*t*-Butylthio)-Oligonukleotid-A. Die unterschiedlichen Retentionszeiten von Edukt und Produkt lassen sich durch die höhere Hydrophobizität des Produktes erklären. Durch Integration der Peakflächen im Chromatogramm ergibt sich eine Ausbeute für die Cystein-Kopplung von 79 %.

Aufgereinigt wurde das entstandene Cys-Oligonukleotid-A ebenfalls mithilfe von RP-HPLC. Dazu wurde eine semipräparative C18-Säule mit einer Flussrate von 2 ml/min verwendet. Der Gradient verlief dabei von 5 % B in A hin zu 100 % B über 60 min.

Das gereinigte Produkt wurde im Anschluss zusätzlich über analytische RP-HPLC und MALDI-MS auf seine Reinheit hin analysiert. Das HPLC-Chromatogramm ist dabei in Abbildung 3.4 (links) zu sehen. Das Signal bei 18,4 min entspricht dabei dem Cys-Oligonukleotid-A mit abgespaltener S-*t*-Butylthio-Schutzgruppe und das Signal bei 20,4 min entspricht dem erwünschten Produkt. Das MALDI-MS (Abb. 3.4 rechts) zeigt zwei Massen von 7743 und 3872 m/z, welche dem einfach bzw. dem zweifach geladenen Produkt entsprechen. Die gefundene Masse stimmt gut mit der berechneten Masse für das Cys-Oligonukleotid-A von 7749 g/mol überein. Die Abweichung lässt sich durch unzureichende Kalibrierung der Messung erklären. Als Gesamtausbeute der Cystein-Modifikation samt aller Reaktions- Aufarbeitungs- und Reinigungsschritte ergaben sich ca. 60 %.

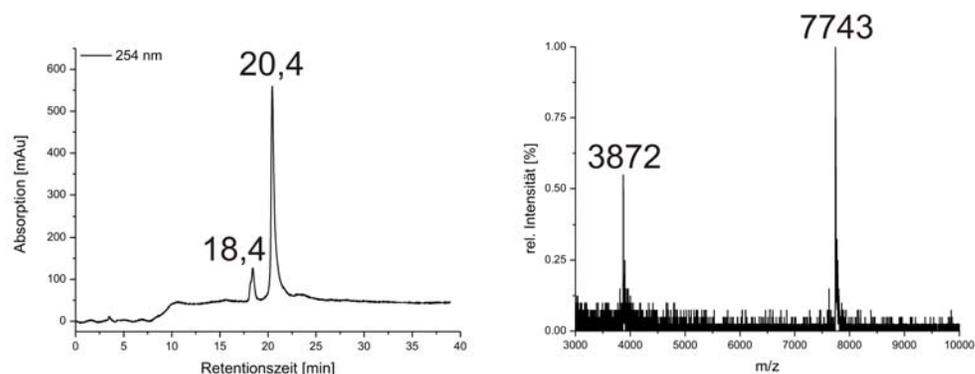


Abb. 3.4: HPLC-Chromatogramm des gereinigten Cys-Oligonukleotid-A mit einer analytischen C18-Säule (links). MALDI-MS des gereinigten Produktes (rechts).

In der Tabelle 3.1 finden sich die entsprechenden Ergebnisse der übrigen modifizierten Oligonukleotide. Es sind sowohl die bestimmten Massen, als auch die Ausbeuten der Modifizierungsreaktion und die Gesamtausbeuten nach allen Reinigungsschritten gezeigt. Die dazugehörigen MALDI-Spektren befinden sich im Anhang 7.1 bis 7.6, die Sequenzen der Oligonukleotide in Material und Methoden Abschnitt 2.5.

Bei den erhaltenen Massen für die jeweiligen Cystein-Oligonukleotide gibt es dabei keine nennenswerten Abweichungen von den berechneten Massen. Die größte Abweichung gibt es für das Cys-Oligonukleotid C mit 5 Da, die Oligonukleotide F3 und F4 zeigen keine Abweichung.

Auch die Ausbeuten der Modifizierungsreaktion liegen für alle Oligonukleotide in der selben Größenordnung. Das Oligonukleotid F2 zeigte mit 65 % eine ähnliche Gesamtausbeute, wie das Oligonukleotid A, die der anderen lagen mit ca. 44 % deutlich niedriger.

Tabelle 3.1: Ausbeuten zur Cystein-Modifizierung der verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Masse berechnet [g/mol]	Masse gefunden [g/mol]	Ausbeute Reaktion [%]	Gesamtausbeute [%]
C (26mer)	8457	8452	72	43
D (19mer)	6072	6070	78	46
F2 (22mer)	7000	6999	83	65
F3 (22mer)	7120	7120	82	48
F4 (22mer)	7040	7040	88	42
F6 (22mer)	7053	7052	84	42

3.2.3 Expression und Reinigung der Ypt-Proteine

Die Expression und Reinigung der Ypt-Proteine ist im Folgenden beispielhaft anhand des Ypt1 Δ 2C gezeigt. Das Ypt1 gehört zur Ypt/ Rab-Familie und ist an der Exocytose beteiligt. Es spielt eine Rolle beim Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum cis-Golgi und vom cis-Golgi zum medialen Golgi (Segev 2001). Zur Expression des Ypt1 Δ 2C wurde das Plasmid pTWIN-1 verwendet (NEB). In dem Vektor pTWIN-1 steht das Fragment des Ypt1 Δ 2C-Fusionsproteins unter der Kontrolle des T7-Promotors, welcher durch das lacI-Operon reguliert wird. Somit kann die Expression des Fusionsproteins durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert werden. Das Konstrukt verfügte zu Aufreinigungszwecken C-terminal über eine *chitin binding domain* (CBD) und zur

Generierung eines C-terminalen α -Thioesters über ein Mxe-Intein zwischen dem Protein und der CBD. Zur Expression wurden *E. coli* BL21(DE3)RIL Zellen verwendet. Bei diesen Zellen ist das Gen zur Expression der T7-RNA-Polymerase in das Genom integriert und befindet sich unter der Kontrolle des lacUV5-Operators.

Die über Nacht bei 37°C gewachsene Vorkultur wurde mit 2TY-Medium mit entsprechenden Antibiotika auf eine OD₅₇₈ von etwa 0,06 verdünnt und anschließend bei 37°C wachsen gelassen. In der mittleren logarithmischen Phase (OD ~ 0,6) wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und dann über Nacht bei 20°C geschüttelt. Das gewünschte Fusionsprotein wurde überexprimiert und die Zellen mechanisch mit dem Microfluidizer aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30 min, 20000 rpm, 4°C) von den löslichen Bestandteilen abgetrennt. Der Überstand, der das lösliche Zielprotein enthielt, wurde dekantiert und das Fusionsprotein mit Hilfe von Chitinbeads gereinigt.

Dazu wurden Chitinbeads zuerst mit 5 Säulenvolumen Waschlösung (25 mM NaPi, 0,5 M NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 μ M GDP, pH 7,5) equilibriert. Anschließend wurde der Überstand aufgetragen und die Fusionsproteine im langsamen Fluss (~2 ml/min) auf die Chitinbeads geladen. Danach wurden die *beads* mit 10 Säulenvolumen Waschlösung gewaschen.

Zum Spleißen des Fusionsproteins und Generierung des C-terminalen Mesna-Thioesters wurden die Chitinbeads mit zwei Säulenvolumen des Puffers versetzt und über Nacht bei 4°C bei einer Gesamtkonzentration von 250 mM MESNA inkubiert. Anschließend wurde das Ypt1 Δ 2C im Durchfluss gesammelt und die *beads* mit 5 Säulenvolumen Waschlösung gewaschen.

Die Analyse der Überexpression durch SDS-PAGE ist in der Abbildung 3.5 (A) gezeigt. Dabei ist in der Bahn 1 eine Zellprobe vor Induktion, in Bahn 2 eine Probe nach Induktion aufgetragen. Im Falle der Bahn 2 ist eine neue Bande bei etwa 50 kDa entstanden, welche dem Gesamtfusionskonstrukt entspricht.

In Abb. 3.5 (B) ist eine SDS-PAGE der Aufreinigung mittels Chitinbeads gezeigt. Dabei sind in den Bahnen 3 und 4 der Durchfluss, in den Bahnen 5 bis 8 die Waschschrte und in den Bahnen 9 bis 12 die Elutionsfraktionen nach erfolgtem Spleißen aufgetragen. Im Durchfluss und in den Waschfraktionen finden sich Banden bei etwa 50 kDa, welche dem Fusionskonstrukt entsprechen könnten. Dies lässt sich durch eine unzureichende Menge an Chitinbeads bzw. eine mangelhafte Qualität bzgl. deren Bindungseigenschaften erklären.

In den Elutionsfraktionen ist lediglich eine einzelne Bande bei ca. 23 kDa zu erkennen, welche dem gereinigten Ypt1 Δ 2C entspricht.

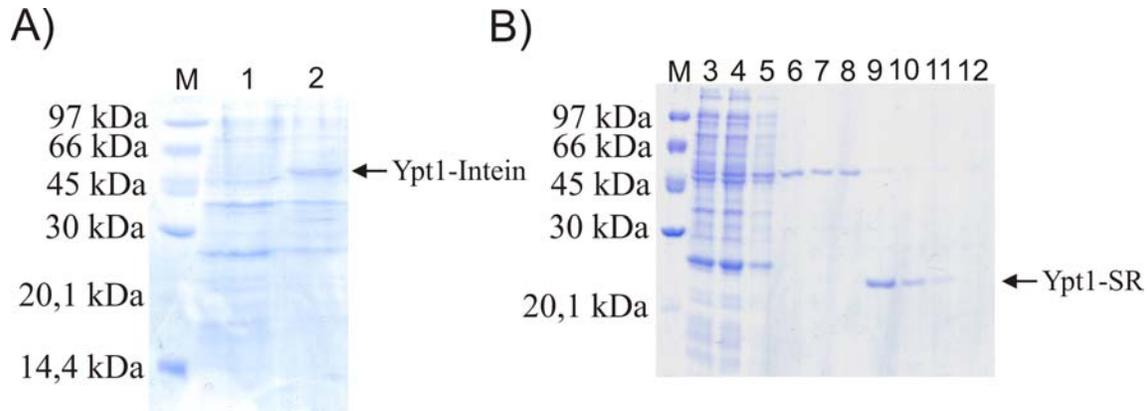


Abb. 3.5: SDS-PAGE der Expressionskontrolle von *Ypt1Δ2C* (A). Bahn 1: vor Induktion Bahn 2: nach Induktion. B: SDS-PAGE zur Analyse der Reinigung und des Spleißens des *Ypt1Δ2C*-Fusionskonstruktes. Bahn 3 u. 4: Durchfluss; Bahn 5–8: Waschfraktionen; Bahn 9–12: Elutionsfraktionen.

Die vereinigte Elutionsfraktionen wurden konzentriert und über eine S75 Größenausschluss-Chromatographie-Säule im präparativen Maßstab gereinigt. Die Produkt-enthaltenden Fraktionen wurden erneut vereinigt und konzentriert. Aus einem Liter Expressionskultur konnten ca. 3,3 mg Ypt1-Thioester gewonnen werden.

Zur Analyse der Reinheit des erhaltenen Proteins wurde eine SDS-PAGE und ein ESI-MS durchgeführt (Abb. 3.6).

Im Falle der SDS-PAGE ist in der ersten Bahn das gereinigte *Ypt1Δ2C* aufgetragen. Es sind drei Banden zu sehen. Die oberste Bande, bei ca. 50 kDa, entspricht einem Rest ungesplissenem Fusionskonstrukt, die Bande bei ca. 30 kDa dem Mxe-Intein, welche mit von der Chitin-Säule gewaschen wurden und die unterste Bande bei ca. 24 kDa entspricht dem *Ypt1Δ2C*.

In Abbildung 3.6 (B) ist das ESI-MS-Spektrum und das dekonvolutierte Spektrum des *Ypt1Δ2C* gezeigt. Es treten die Ladungszustände von 12 bis 22 positiven Ladungen pro Molekül von 1928,4 bis 1052,2 m/z auf. Nach Dekonvolution wird eine Masse von 23129 g/mol erhalten, welche mit der berechneten Masse von 23131 g/mol gut übereinstimmt.

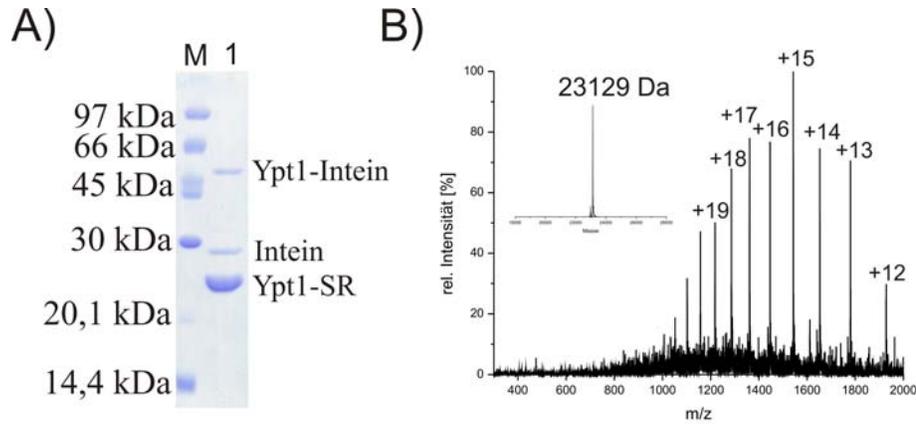


Abb. 3.6: A: SDS-PAGE des *Ypt1Δ2C*. Bahn 1: gereinigtes Protein. B: ESI-MS des *Ypt1Δ2C*.

3.2.4 Expression und Aufreinigung von Cherry-Ypt7Δ3

Die GTPase Ypt7 gehört zur Ypt/ Rab-Familie und ist am Transport des späten Endosoms zur Vakuole und bei der Verschmelzung des Endosoms mit der Vakuole beteiligt (Segev 2001). Es wurde N-terminal als Fusionsprotein mit der GFP-Mutante (*green fluorescence protein*) Cherry und C-terminal mit einem Mxe-Intein und der CBD im Vektor pTWIN-1 kloniert. Das Cherry-Ypt7 soll in einem Mikroarray-Experiment zur direkten Fluoreszenzdetektion einer Hybridisierung des Protein-DNA-Konjugates mit einem Fängeroligonukleotid verwendet werden. Zur Expression wurden *E. coli* BL21(DE3)RIL Zellen verwendet. Die Expressionskultur wurde im 1,5 l Maßstab angesetzt. Durchgeführt wurde sie, wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben.

Aufgereinigt wurde das Fusionsprotein ebenfalls mit Hilfe von Chitinbeads, wie in Abschnitt 2.8.2 beschrieben. Das Spleißen erfolgte wie in Abschnitt 2.8.3 beschrieben. Dabei wurde der C-terminale α -Thioester des Cherry-Ypt7Δ3 generiert. Das Protein wurde mit Hilfe einer Größenausschluss-Chromatographie auf einer präparativen S75-Säule gereinigt, die Produktenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und konzentriert. Aus 1,5 l Expressionskultur konnten ca. 5 mg Protein isoliert werden.

In der Abbildung 3.7 (A) ist ein SDS-Gel des Cherry-Ypt7Δ3 in der Coomassieblau-Färbung und im Fluoreszenzscan gezeigt. In Bahn 1 ist dabei jeweils bei ca. 45 kDa die Bande für das Cherry-Ypt7Δ3 zu sehen. Die schwache Bande bei ca. 80 kDa entspricht dem ungesplissemem Fusionsprotein. Die schwache Bande bei ca. 60 kDa, welche nicht fluoresziert ist nicht zuzuordnen.

3. Ergebnisse

Außerdem ist in Abb. 3.7 (B) das ESI-MS-Spektrum und das dekonvolutierte Spektrum des Cherry-Ypt7 Δ 3 gezeigt. Es treten die Ladungszustände von 26 bis 63 positiven Ladungen pro Molekül von 1983,9 bis 820,1 m/z auf. Nach Dekonvolution wird die Masse 51563 g/mol erhalten, welche in guter Übereinstimmung mit der Produktmasse des Cherry-Ypt7 Δ 3 von 51562 g/mol ist.

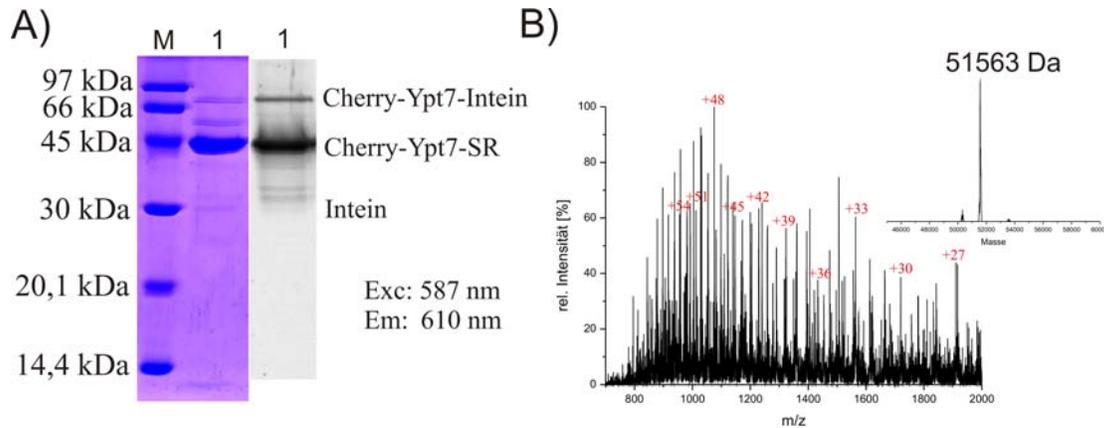


Abb. 3.7: A: Analyse des überexprimierten und gereinigten Cherry-Ypt7 Δ 3 durch SDS-PAGE. Dabei ist in der Coomassie-Färbung und im Fluoreszenzscan in der Bahn 1 das gereinigte Protein aufgetragen. Das Absorptionsmaximum des Cherry beträgt 587 nm, das Emissionsmaximum 610 nm. B: ESI-MS.

Die Daten für die übrigen Ypt-Proteine sind in der Tabelle 3.2 angegeben. Zu sehen sind jeweils Informationen über das im Vektor codierte Konstrukt, die berechnete Masse des Konstruktes ohne N-terminales Methionin, die durch MALDI-MS erhaltene Masse und die Ausbeute der Expression.

Die MALDI-Spektren weisen meist noch Verunreinigungen auf, welche durch die Affinitätschromatographie über Chitinbeads nicht entfernt werden konnten. Außerdem waren die Signale im Massenspektrum teilweise stark verbreitert. Daher weichen die gemessenen Massen zwischen 1 g/mol z. B. für das Sec4-SR und 26 g/mol für das Ypt53-SR von den berechneten Massen ab. Für das Ypt10-SR und Ypt11-SR konnte kein sinnvolles Massenspektrum gemessen werden. Die Spektren befinden sich im Anhang 7.7.

Die erhaltenen Expressionsausbeuten weisen eine hohe Varianz auf. Sie gehen von 0,6 mg/l für das Ypt6-SR bis hin zu 23,5 mg/l für das Ypt31-SR.

Tabelle 3.2: Expressionsausbeuten der Ypt-Thioester und MALDI-Daten nach Reinigung

Protein	Konstrukt	Masse	Masse	Ausbeute mg/l
		berechnet -M	gefunden	
Sec4	Δ2C N213→S	23265	23264	18,2
Ypt6		24406	24403	0,9
Ypt7	Δ3C	22742	22739	12,7
Ypt10		23969	-	2,3
Ypt11	A62→V	40699	-	3,7
Ypt31	D58→E	24476	24472	23,5
Ypt32		24513	24533	6
Ypt51	E136→K	23074	23067	15,3
	N199→D			
Ypt52		26256 (+M)	26242	3,5
Ypt53		24641	24615	5,4

3.3 Native chemische Ligation der Ypt-Proteine

3.3.1 Testligation des Ypt1Δ2C-SR mit dem Peptid H-CGK_(NBD)GHHHHHH-OH

Zur Analyse der Fähigkeit des Ypt1Δ2C in einer nativen chemischen Ligation (NCL) reagieren zu können, wurde die Ligation zunächst mit einem Testpeptid durchgeführt. Das verwendete Testpeptid H-CGK_(NBD)GHHHHHH-OH wurde durch Fmoc-SPPS an einem His-Wang-Harz hergestellt und mittels präparativer RP-HPLC gereinigt (Becker *et al.* 2006). Es enthält ein N-terminales Cystein, um mit den Ypt-Proteinen, welche einen C-terminalen α-Thioester enthalten ligieren zu können. Außerdem trägt es noch den Fluorophor N³-Nitrobenzofurazan-L-1,3-diaminopropionsäure (NBD). Dadurch können auch geringe Ligationsausbeuten im Fluoreszenzscan eines SDS-Gels detektiert werden, welche ansonsten aufgrund des kleinen Massenzuwachses durch das Peptid während der Ligation unentdeckt blieben.

Die Testligationen wurden unter nativen Bedingungen bei RT durchgeführt. Dabei lag das jeweilige Ypt-Protein in einer Konzentration von etwa 40 μM vor. Das NBD-enhaltende Peptid wurde in einem Überschuss von 5 moleq. Der Reaktion hinzugegeben. Als Ligationsvermittler wurde 2 % Thiophenol verwendet, welches in einer Umesterungsreaktion

3. Ergebnisse

den Mesna-Thioester austauscht und eine bessere Abgangsgruppe während des nukleophilen Angriffs des Peptids ist.

Die Analyse der Testligation mittels SDS-PAGE ist in Abbildung 3.8 gezeigt. Zu sehen ist das SDS-Gel einmal in der Coomassieblau-Färbung, außerdem noch als Fluoreszenzscan vor Färbung des Gels. In der Bahn 1 ist jeweils das eingesetzte Ypt1 Δ 2C, in der Bahn 2 jeweils die Ligationsmischung aufgetragen. Im Fall der Ligationsmischung ist in der Coomassie-Färbung eine neue Bande bei etwa 25 kDa entstanden, welche dem Ligationsprodukt entspricht. Die durch die Intensität der Banden ermittelte Ausbeute beträgt 92 %.

Im Fluoreszenzscan gibt es kein Signal für die Bahn 1. In der Bahn 2 ist eine stark fluoreszierende Bande bei ca. 25 kDa zu sehen, welche nur durch eine erfolgreiche Ligation zustande kommen kann. Die stark verschmierte Bande bei ca. 4 kDa entspricht dem NBD-gelabelten Peptid.

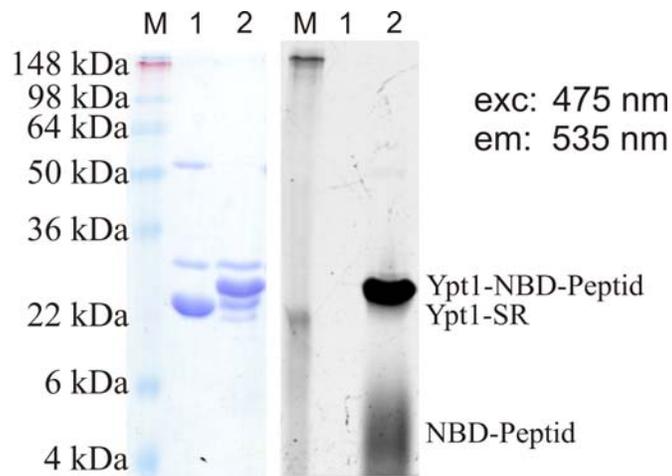


Abb. 3.8: Analyse der Ypt1 Δ 2C-Testligation mit dem Peptid H -CGK_(NBD)GHHHHHH-OH mithilfe eines SDS-Gels in der Coomassie-Färbung und eines Fluoreszenzscans. Bahn 1: Ypt1 Δ 2C; Bahn 2: Ligationsmischung. Das Absorptionsmaximum des NBD beträgt 475 nm, das Emissionsmaximum 535 nm.

Die Ligationsausbeuten der anderen Ypt-Proteine mit dem NBD-Testpeptid sind in der Tabelle 3.3 angegeben. Es zeigen sich mit 80–90 % sehr gute Ausbeuten für das Sec4, Ypt31, Ypt32 und das Ypt52. Die Ausbeute für das Ypt53 ist mit 20 % mäßig gut. Diese Ypt-Proteine wurden zur Ligation mit Oligonukleotiden verwendet.

Für das Ypt6, Ypt10, Ypt11 und Ypt51 werden unzureichende Ausbeuten mit maximal 5-10 % für das Ypt6 erreicht. Die Gründe sind wahrscheinlich eine Hydrolyse des α -Thioesters oder eine Unzugänglichkeit des C-Terminus. Ligationen unter denaturierenden Bedingungen für die genannten Proteine ergaben außer beim Ypt10 eine Steigerung der

Ligationsausbeuten auf 10-20 %, was die Annahme einer Unzugänglichkeit der C-Termini unterstützt.

Tabelle 3.3: Ligationsausbeuten der Ypt-Proteine mit dem Testpeptid $\text{H-CGK}_{(\text{NBD})}\text{GHHHHHH-OH}$

Protein	Ausbeute/ %	Ausbeute/ % denaturierend
Sec4-SR	90	
Ypt6-SR	5-10	20
Ypt7-SR	80-90	
Ypt10-SR	0	Spuren
Ypt11-SR	0	5-10
Ypt31-SR	80-90	
Ypt32-SR	80-90	
Ypt51-SR	Spuren	10
Ypt52-SR	90	
Ypt53-SR	20	

3.3.2 Optimierung der Ligation der Ypt-Proteine mit den Cys-Oligonukleotiden am Beispiel von Ypt1 Δ 2C und Cys-Oligonukleotid-A

Die Ligation von Proteinen mit DNA über die native chemische Ligation unter Standardbedingungen führte nur zu sehr schwachen Ausbeuten, daher wurden Anstrengungen zur Optimierung der Reaktion unternommen.

So ist in diesem Fall Thiophenol als Ligationsvermittler gänzlich ungeeignet, da seine Löslichkeit in Wasser relativ gering ist. Es bildet Disulfide und präzipitiert. Dabei wirkt es denaturierend auf die in der Lösung vorliegenden Proteine. Um native, aktive Proteine zu behalten müssen also andere Ligationsvermittler herangezogen und getestet werden. Mesna ist als ein Salz sehr gut in Wasser löslich, ist jedoch inaktiver da es eine schlechtere Abgangsgruppe bei dem nukleophilen Angriff des Cysteins ist (Dawson *et al.* 1997). Auch MPAA ist in basischer Umgebung gut löslich. Ethanthiol ist ebenso wie Thiophenol schlecht löslich und bildet eine gute Abgangsgruppe. Es fällt allerdings nicht aus und wirkt daher nicht denaturierend auf die beteiligten Proteine.

Der pH-Wert bei der NCL ist ein kritischer Punkt. Einerseits steigt die Nucleophilie der Sulfhydryl-Gruppe mit steigendem pH-Wert, andererseits erhöht sich ebenso die Hydrolysegeschwindigkeit des Thioesters. Normalerweise werden NCL bei einem leicht

3. Ergebnisse

basischen pH-Wert von 7,2 bis 7,5 durchgeführt. Eigene Erfahrungen, aber auch die Literatur deuten darauf hin, dass zur effizienten Ligation von Proteinen mit DNA pH-Werte um 8,0 herum benötigt werden (Takeda *et al.* 2004; Lovrinovic und Niemeyer 2005).

Die Temperatur wurde in den meisten Versuchen konstant auf 4°C gehalten um auch diesen Faktor zu einer möglichen Denaturierung der beteiligten Proteine auszuschließen. Ein Ansatz wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die getesteten Reaktionsbedingungen und die resultierenden Ausbeuten sind in der Tabelle 3.4 zusammengefasst. Die Analyse der verschiedenen Ligationsansätze wurde mithilfe SDS-PAGE vorgenommen (Abb. 3.9) und die entsprechenden Ausbeuten über die Intensität der Banden bestimmt. Dabei ist auf den verschiedenen Gelen jeweils das eingesetzte Ypt1Δ2C als Vergleich aufgetragen. Die Nummerierungen der einzelnen Bahnen folgen den Nummerierungen der verschiedenen Reaktionsbedingungen in der Tabelle 3.4.

In den Bahnen 1-5 ist jeweils bei 25 kDa die Bande für das unligierte Ypt1-SR, bei 29 kDa die Bande für eine Verunreinigung an Intein und bei 47 kDa eine Bande für eine Verunreinigung an nicht gesplissem Fusionskonstrukt zu sehen. Außerdem ist in allen Bahnen, außer der Dritten eine neue Bande bei 33 kDa zu sehen, welche dem Ligationsprodukt entspricht.

Tabelle 3.4: Optimierung der Ligation zur Darstellung von Protein-DNA-Konjugaten

	Mesna/ mM	MPAA/ eq.	EtSH/ % (v/v)	eq. DNA	pH	T/ °C	Zeit	Ausbeute
1	250	-	4	5	8,3	4°C	48h	43 %
2	500	-	-	5	8,3	4°C	48h	32 %
3	-	50	-	5	8,3	4°C	48h	0 %
4	250	-	4	1	8,3	4°C	48h	29 %
5	250	-	4	5	8,3	RT	24h	54 %

Dabei ist mit 54 % das beste Ergebnis durch den kombinierten Einsatz von Mesna und Ethanthiol bei Raumtemperatur erzielt worden (Ansatz 5). Danach folgt mit 43 % der Ansatz 1, welcher bis auf die Temperatur und der Reaktionszeit den selben Reaktionsbedingungen folgte. Nur Mesna zu verwenden ergab lediglich 32 %. Der Einsatz von MPAA zeigte keinerlei Ligationsprodukt. Vermutlich ist das MPAA während der Ligation ausgefallen.

Auch ist zu bemerken, dass die Reduzierung der eingesetzten moleq. an DNA bezogen auf das Protein von 5 auf 1 eq. eine Reduzierung der Ligationsausbeute auf 29 % zur Folge hatte.

Ogleich die Ligation bei RT die größten Erfolge erzielt hatte wurde sie im Folgenden bei 4°C durchgeführt um unnötige Denaturierung und Inaktivierung der Ypt-Proteine zu vermeiden. Auch wurde aus ökonomischen Gründen die DNA-Menge auf 1 moleq. herabgesetzt, da die kommerziell erhältlichen Oligonukleotide weit teurer waren, als die Expression der eingesetzten Proteine.

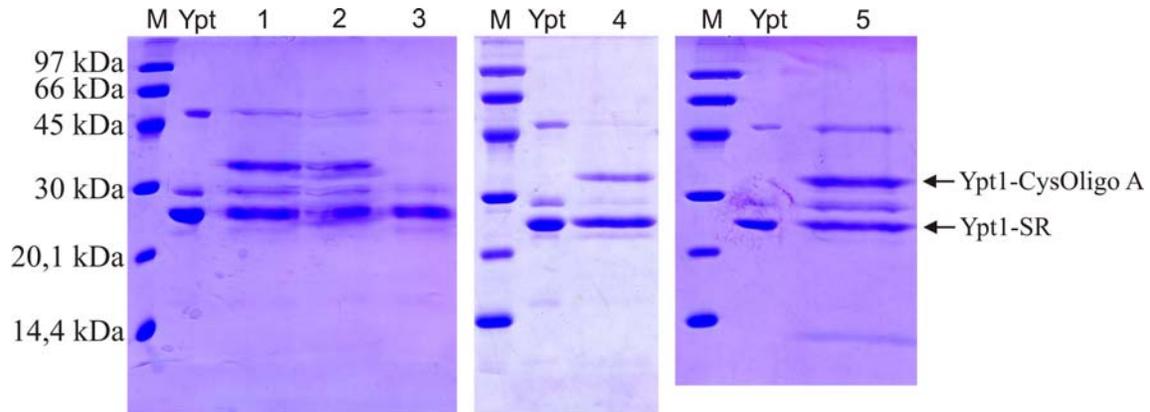


Abb. 3.9: Analyse der Bildung von Protein-DNA-Konjugaten mittels SDS-PAGE. Es ist zum Vergleich auf jedem Gel jeweils das eingesetzte Ypt1 Δ 2C aufgetragen. Die Bahnen 1-5 entsprechen den Ligationsbedingungen 1-5 der Tabelle 3.4.

3.3.3 Analyse von Protein-DNA-Konjugaten durch einen Southernblot

Die Massenspektrometrie von Protein-DNA-Konjugaten ist sehr anspruchsvoll. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für Massenspektrometrie von Peptid-DNA-Konjugaten (Olejnik *et al.* 1999) und auch PNA-DNA-Konjugate sind schon mittels MALDI-MS untersucht worden (Lovrinovic *et al.* 2003). Untersuchungen an Protein-DNA-Konjugaten gibt es dagegen selten. Der Grund ist, dass sich die Eigenschaften von Proteinen und DNA für die Massenspektrometrie gegensätzlich verhalten, z. B. in der Ionisierung oder der verwendeten Matrix.

Um dennoch auf einfachem Wege die Bildung eines Protein-DNA-Konjugates zweifelsfrei nachzuweisen wurde ein abgewandelter *Southernblot* entwickelt. Dabei wurde dem in der Abbildung 3.10 (links) gezeigten Schema gefolgt.

Nach der Gel-Elektrophorese und der Überführung der Proteine und des Konjugates auf die Nitrocellulose wurde die Membran über Nacht mit einem 5'-biotinylierten Oligonukleotid inkubiert, welches komplementär zu der an das Protein gekoppelten Sequenz war. Nach der Hybridisierung folgte ein Waschschrift. Anschließend wurde die Membran einer Streptavidin-alkalische Phosphatase (AP)-Konjugat-enthaltenden Lösung ausgesetzt. Das Streptavidin und

damit indirekt die AP konnte nur dort binden, wo sich Biotin und damit auch das erwünschte Oligonukleotid befand. Die Zugabe des NBT/BCIP-Reagenzes führte zu einer Dephosphorylierung des BCIP durch die AP und damit zu einem blau-violetten Präzipitat auf der Nitrocellulose.

Die entsprechende Cellulosemembran und das dazugehörige SDS-Gel sind in der Abbildung 3.10 rechts abgebildet. Dabei ist in der Bahn 1 jeweils das Ypt1 Δ 2C aufgetragen und in der Bahn 2 die Analyse des Ligationsgemisches. Auf der Nitrocellulose ist im Fall des Ypt1 kein Signal zu detektieren. Im Fall der Ligationsmischung ist eine eindeutige starke Bande auf Höhe der neuen Bande im SDS-Gel, also dem Ligationsprodukt zu erkennen. Das beweist zweifelsfrei die Bildung eines Protein-DNA-Konjugates. Der *blot* ist überbelichtet worden, um auch die schwächeren Banden auf der Membran sichtbar zu machen. Diese entsprechen freiem nicht umgesetzten Oligonukleotid aus der Reaktionsmischung. Dieses bildet einige distinkte Banden, vermutlich aufgrund von Oligomerisierung.

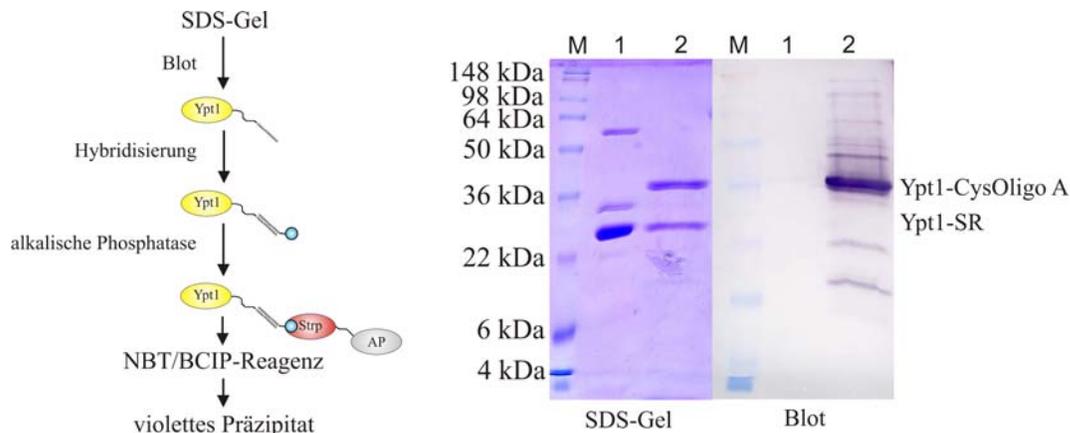


Abb. 3.10: Schema zur Vorgehensweise bei dem abgewandelten Southernblot (links). Analyse der Konjugatbildung via SDS-Gel und Southernblot (rechts). Bahn 1: Ypt1 Δ 2C; Bahn 2: Ligationsgemisch.

3.3.4 Native chemische Ligation des Cherry-Ypt7 Δ 3 mit Cys-Oligonukleotid-D

Das Cherry-Ypt7 Δ 3 wurde wie in Abschnitt 2.10.2 beschrieben mit dem Cystein-modifizierten Oligonukleotid D durch die NCL verknüpft. In der Abbildung 3.11 ist die Analyse der Ligationseffizienz durch ein SDS-Gel in der Coomassieblau-Färbung, des dazugehörigen Fluoreszenzscans und durch den *Southernblot* zur Detektion von Protein-DNA-Konjugaten gezeigt. Dabei ist jeweils in der Bahn 1 das Cherry-Ypt7 Δ 3 und in der Bahn 2 die Ligationsmischung aufgetragen. Im Falle des SDS-Gels zeigt sich jeweils eine neue Bande bei etwa 58 kDa, welche dem Ligationsprodukt Cherry-Ypt7 Δ 3-Oligonukleotid-

3. Ergebnisse

D entspricht. Im *Southernblot* ist kein Signal für das Cherry-Ypt7 Δ 3 zu sehen (Bahn 1) aber eine deutliche blau-violette Bande auf Höhe des Ligationsprodukts. Auch in diesem Fall sind durch Überbelichtung schwache Banden zu sehen, welche dem nicht umgesetzten Oligonukleotid zugesprochen werden.

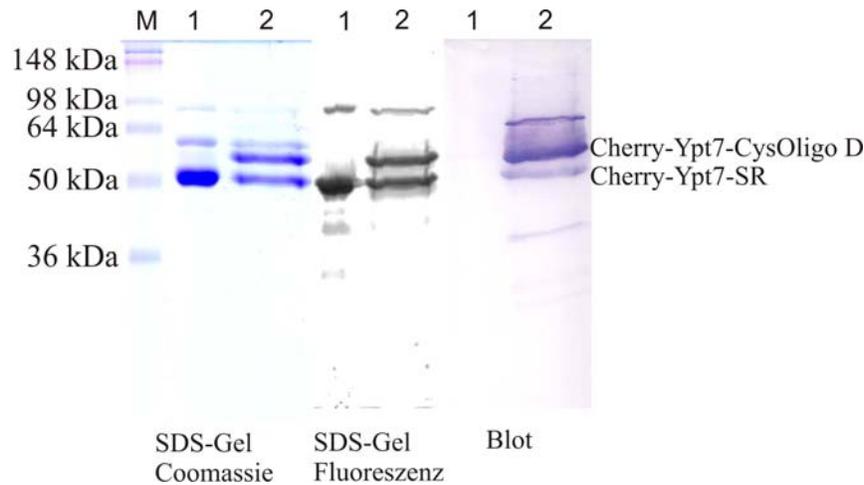


Abb. 3.11: SDS-Gel in der Coomassie-Färbung und im Fluoreszenzscan und Southernblot zur Analyse der Ligation zwischen Cherry-Ypt7 Δ 3 und dem Cys-Oligonukleotid-D. Bahn 1: Cherry-Ypt7 Δ 3; Bahn 2: Ligationsmischung.

In der Tabelle 3.5 sind die Ligationsausbeuten der Ypt-Proteine Sec4, Ypt7, Ypt31, Ypt32, Ypt52 und Ypt53 mit den Oligonukleotiden F3, F4 und F6 angegeben. Die Ausbeuten variieren von 5-10 % für das Sec4 und das Ypt7 bis 35 % für das Ypt31 und das Ypt53. Diese beiden und das Ypt52 mit 20 % Ausbeute liegen im Bereich der Ligationsausbeute des Ypt1 mit dem Oligonukleotid A von 29 %. Die niedrigen Ausbeuten der anderen drei Ypt-Proteine sind durch eine Hydrolyse des Thioesters nicht zu erklären, da die jeweiligen Testligationen mit dem NBD-Peptid in allen drei Fällen 90 % oder mehr betragen.

Tabelle 3.5: Ausbeuten der Bildung der Ypt-DNA-Konjugate

Protein	Oligonukleotid	Ausbeute/ %
Sec4-SR	F3	5-10
Ypt7-SR	F6	5-10
Ypt31-SR	F3	35
Ypt32-SR	F4	10
Ypt52-SR	F4	20
Ypt53-SR	F3	35

3.3.5 Reinigung der Protein-DNA-Konjugate durch Größenausschlusschromatographie

In einem Mikroarray-Experiment kann nicht umgesetztes Protein durch einfaches Waschen entfernt werden. Lediglich das Protein-DNA-Konjugat bindet an die Chip-Oberfläche. Allerdings gilt das in gleichem Maße für das nicht umgesetzte Oligonukleotid, da es die selbe Nukleobasensequenz trägt. Daher ist es erforderlich dieses möglichst vollständig zu entfernen, da es sonst um die freien Bindungsstellen auf dem DNA-Mikroarray mit dem Konjugat konkurrieren und eine Abschwächung der Oberflächenbeladung hervorrufen würde.

Zur Abtrennung des nicht umgesetzten Oligonukleotids kann man Ionenaustauschchromatographie verwenden (Lovrinovic und Niemeyer 2005). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden Anstrengungen unternommen die erhaltenen Konjugate auf diesem Wege zu reinigen. Dazu wurde eine DEAE-Anionenaustauschersäule verwendet. Im analytischen Maßstab konnte eine vollständige Trennung von Produkt und Edukt erreicht werden. Da aber die Konjugate durch die stark negativ geladenen kovalent gebundenen Oligonukleotide sehr stark an das Säulenmaterial binden, wird eine entsprechend hohe Konzentration an NaCl benötigt, um sie wieder von der Säule zu eluieren. Dadurch wird ein Umpuffern des Produktes erforderlich was zu einer Minderung der Ausbeute führen kann. Außerdem kann das Protein durch die immense Erhöhung der Ionenstärke im Puffer denaturieren.

Daher wurden die Konjugate über Größenausschluss-Chromatographie gereinigt. Dazu wurde eine analytische S2000 Gelfiltrationssäule für HPLC-Systeme von Phenomenex verwendet. Die Reinigung verlief dabei isokratisch im für das Protein nativen Puffer (25 mM NaPi, 0,5 M NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 µM GDP, pH 7,5) bei einer Flussrate von 0,5 bzw. 1 ml/min. Ein Nachteil der Gelfiltration ist allerdings eine Verdünnung des gereinigten Produktes.

Das erhaltene Chromatogramm und die Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE sind in der Abbildung 3.12 gezeigt. Im Chromatogramm (A) zeigen sich drei Signale. Das erste bei 18,5 min entspricht dem Ypt1-Oligonukleotid-A-Konjugat. Das zweite Signal dem nicht umgesetzten Protein und dem nicht umgesetzten Oligonukleotid. Dabei verhält sich das Oligonukleotid auf der Gelfiltrationssäule in etwa so, wie ein globuläres Protein der dreifachen Größe. Der dritte Peak bei etwa 26,9 min entspricht den Ligationsvermittlern Ethanthiol und Mesna. Mesna sollte keine Absorption bei 260 nm zeigen. Durch die Auftragung von Mesna und Ethanthiol auf die Säule wurde jedoch eine hohe Absorption detektiert, welche vermutlich auf Verunreinigungen während des Herstellungsprozesses der Chemikalien basiert.

3. Ergebnisse

Das SDS-Gel in der Silberfärbung (**B**) bestätigt dies. In der Bahn 1 ist die Reaktionsmischung als Vergleich aufgetragen. Es ist die Proteinbande bei etwa 24 kDa und die Konjugat-Bande bei etwa 30 kDa zu sehen. Das nicht umgesetzte Oligonukleotid wird nicht angefärbt. In den Bahnen 2 und 3 sind zwei Fraktionen des Signals bei 18,5 min aufgetragen, in den Bahnen 4 und 5 zwei Fraktionen des Signals bei 20,7 min.

Für die beiden Fraktionen des ersten Peaks ist eindeutig eine Bande auf Höhe des Ligationsproduktes zu erkennen. In den Fraktionen des zweiten Peaks ein Gemisch aus Edukt und Produkt. Die ersten beiden Fraktionen wurden vereinigt und konzentriert.

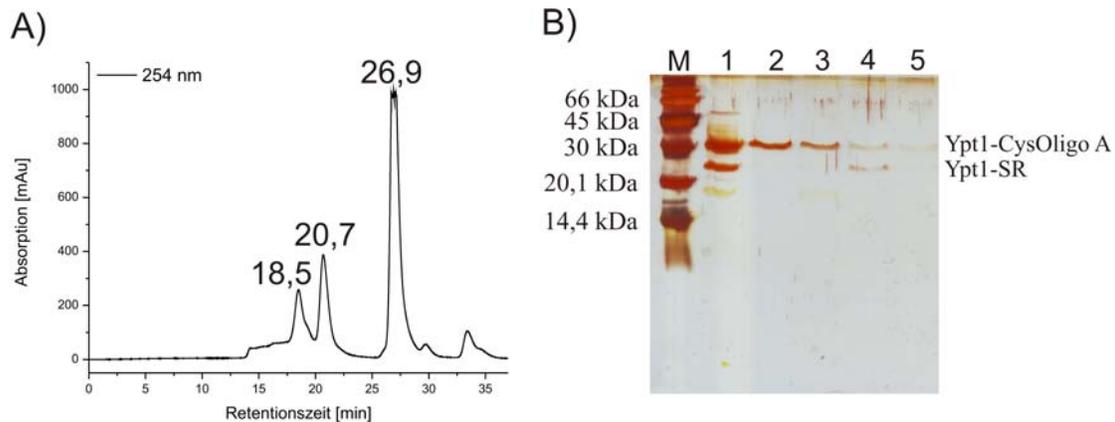


Abb. 3.12: Größenausschlusschromatographie zur Reinigung der Protein-DNA-Konjugate (A). SDS-Gel (Silberfärbung) zur Analyse der erhaltenen Fraktionen (B). Bahn 1: Ligationsmischung als Vergleich; Bahn 2–5: erhaltene Fraktionen aus der Gelfiltration.

3.3.6 Reinigung von Cherry-Ypt7 Δ 3-Oligonukleotid-D durch Größenausschluss-Chromatographie

Das Ligationsprodukt Cherry-Ypt7 Δ 3-Oligonukleotid-D wurde ebenfalls über Größenausschluss-Chromatographie gereinigt. Das erhaltene Chromatogramm und die Analyse der Fraktionen mithilfe eines SDS-Gels sind in der Abbildung 3.13 gezeigt.

Im Chromatogramm sind neben dem Signal für die Ligationsvermittler bei ca. 22 min vier weitere Peaks zwischen 13,9 und 17,2 min zu sehen. Anhand des SDS-Gels, angefärbt durch Silberfärbung, lässt sich schließen, dass der erste Peak (Bahn 2) ein Gemisch aus Ligationsprodukt und Cherry-Ypt7-Intein-Fusionskonstrukt ist. Der zweite und dritte Peak (Bahn 3–4) enthalten eine Mischung aus dem nicht umgesetzten Protein und einer nicht zuzuordnenden Masse bei ca. 60 kDa. Der vierte Peak (Bahn 5) zeigt keine Bande im Gel und entspricht dem nicht umgesetzten Oligonukleotid.

3. Ergebnisse

Dabei ist zu bemerken, dass das Ligationsprodukt trotz annähernd gleichem Molekulargewichts, aufgrund der besonderen Eigenschaften seines kovalent gebundenen Oligonukleotids, auf der Gelfiltrationssäule eher eluiert, als das nicht zu identifizierende Fragment von 60 kDa.

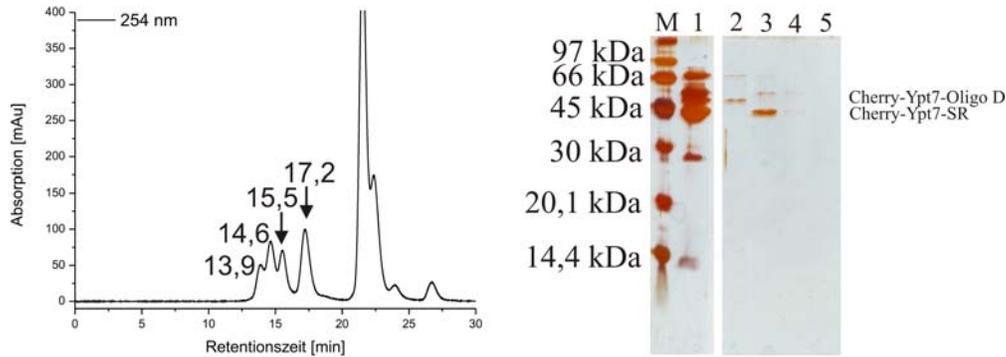


Abb. 3.13: Größenausschluss-Chromatographie des Ligationsprodukts Cherry-Ypt7 Δ 3-Oligonukleotid-D (links). SDS-Gel der erhaltenen Fraktionen nach Silberfärbung (rechts). Bahn 1: Ligationsmischung; Bahn 2–5: Fraktionen 1–4.

3.4 Mikroarray-Experimente der Ypt-DNA-Konjugate

3.4.1 Detektion des Cherry-Ypt7 durch Auslesen direkter Fluoreszenz

Um die immobilisierten Proteine auf der Oberfläche sichtbar zu machen wurde das Ypt7 als Fusionskonstrukt mit dem Cherry-Protein, einer GFP-Mutante, exprimiert und anschließend mit dem Cystein-modifizierten Oligonukleotid D ligiert.

Das Schema des Mikroarray-Experimentes ist in der Abbildung 3.14 gezeigt. Die Mikroarray-Oberfläche wird zunächst mit Blockmilch blockiert und anschließend mit Cherry-Ypt7-Oligonukleotid-D inkubiert. Nach erfolgter spezifischer Immobilisierung des Konjugates an die komplementäre Sequenz D kann der Erfolg direkt durch ein Auslesen der Fluoreszenz untersucht werden.

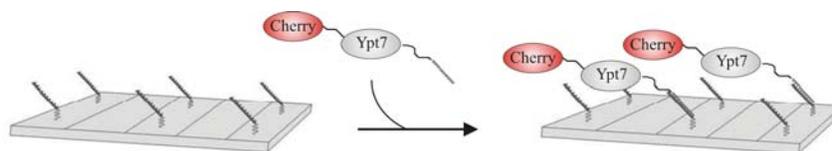


Abb. 3.14: Versuchsschema zur Detektion des Cherry-Ypt7-Konjugates durch Fluoreszenz

3. Ergebnisse

Das Ergebnis des Experimentes ist in der Abb. 3.15 gezeigt. Zu sehen ist der Fluoreszenzscan der Chipoberfläche mit einem Emissionsfilter bei 590 nm. Neben einigen schwächeren unspezifischen Signalen ist eindeutig ein Signal für die beiden Reihen mit der komplementären Sequenz D zu erkennen. Für die Sequenzen A, B und C hingegen ist keinerlei Signal zu sehen. Das Cherry-Ypt7-Konjugat immobilisierte adressiert an der gewünschten Position.

Allerdings wird nur ein Signal zu Rausch-Verhältnis von ca. 3:1 erhalten. Das lässt sich zum Teil dadurch erklären, dass die vorhandenen Laser und Filter des Fluoreszenzscanners nicht exakt mit den entsprechenden Werte des Cherrys mit Exc.: 587 nm und Em.: 610 nm übereinstimmen.

In einem Vergleichsexperiment mit einem Cy5-markierten Oligonukleotid konnten Signal zu Rausch-Verhältnisse von bis zu 13:1 detektiert werden (Anhang 7.8). Allerdings stimmten in diesem Fall die Laser und Scanner des Fluoreszenzscanners perfekt überein. Trotzdem lässt das viel stärkere Signal daraufhin deuten, dass durch das relativ große Protein die Immobilisierung stark gehindert wird.

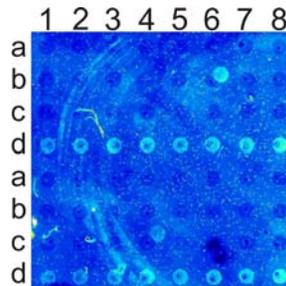


Abb. 3.15: Fluoreszenzscan zur direkten Fluoreszenzdetektion des Cherry-Ypt7-Konjugates

Zusätzlich zur Immobilisierung des Cherry-Ypt7-Konjugates auf dem DNA-Mikroarray wurden einige vergleichende Studien durchgeführt.

So wurde das unligierte Fusionsprotein durch eine kovalente nicht spezifische Methode über seine Lysin-Seitenketten auf einer NHS-funktionalisierten Oberfläche immobilisiert (Patel *et al.* 1997).

Dazu wurde die Chip-Oberfläche zunächst mit Blockmilch blockiert. Dann wurde sie mit dem Fusionsprotein einer Konzentration von 18 μ M eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Oberfläche durch eine zweistündige Behandlung mit 3 M Glycin inaktiviert. Dadurch konnte nach einem Fluoreszenzscan ein Signal zu Rausch-Verhältnis von 7:1 erreicht werden. Als ein weiterer Ansatz zur Protein-Immobilisierung auf festen Trägern wurde eine kovalente und spezifische Methode gewählt. So wurde das Cherry-Fusionsprotein des Ypt7 mit einem

3. Ergebnisse

kleinen Baustein ligiert, welcher C-terminal eine Ethin-Gruppe in das Protein einführt. Dieses konnte dann bioorthogonal mit einer Sulfonylazid-funktionalisierten Oberfläche reagieren (Kolb *et al.* 2001). Es wurde bei Anwesenheit von Cu(I) und Wasser unter milden Bedingungen unter Freisetzung von Stickstoff ein N-Acyl-Sulfonamid gebildet (Govindaraju *et al.* 2008).

Die entsprechenden Ergebnisse sind in der Abbildung 3.16 gezeigt. Links zu sehen ist dabei das ESI-MS und das dekonvolutierte Spektrum des Alkin-modifizierten Cherry-Ypt7-Fusionskonstruktes. Es sind die positiven Ladungen 26–38 pro Molekül von 1987,1 bis 1360,1 m/z zu sehen, welche nach Dekonvolution eine Masse von 51643 g/mol ergeben, was gut mit der berechneten Masse von 51635 g/mol übereinstimmt. Die zwei nicht identifizierten Signale von 42214 g/mol und 47753 g/mol können in einem nachfolgenden Mikroarray-Experiment durch einfaches Waschen der Oberfläche entfernt werden, da sie nicht binden können.

Rechts zu sehen ist der Fluoreszenzscan der Oberfläche. Dabei wurden für das Cherry-Ypt7 vier verschiedene Konzentrationen von 100 bis 12,5 μM eingesetzt. Als negativ-Kontrolle diente das unmodifizierte Cherry-Ypt7-Konstrukt gleicher Konzentrationen.

Auch in diesem Fall zeigt das Experiment eine hochspezifische Immobilisierung des Proteins. Es wird dabei ein Signal zu Rausch-Verhältnis von etwa 26:1 erhalten. Das zeigt, dass diese Methode bioorthogonal ist und nicht von den Proteinseitenketten eingegangen oder gestört werden kann.

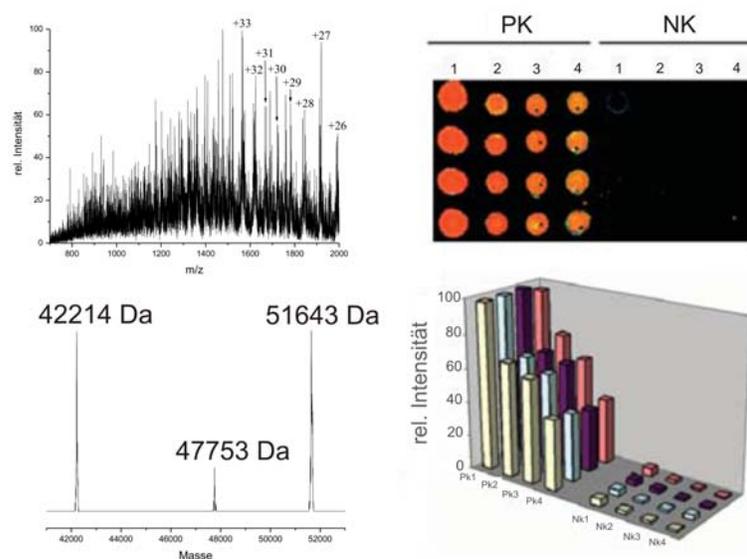


Abb. 3.16: ESI-MS und dekonvolutierte Spektrum für das Alkin-modifizierte Cherry-Ypt7-Fusionsprotein (links). Fluoreszenzscan des über die Click-Sulfonamid-Methode immobilisierten Proteins (rechts).

3.4.2 Aktivierung der immobilisierten Ypt-Protein durch einen GDP-GTP-Austausch

Damit an die immobilisierten Ypt-Proteine mögliche *downstream*-Effektoren binden können, müssen die Ypt-Proteine zunächst in ihre aktive Form überführt werden. Dazu wird ein GDP-GTP-Austausch am Protein durchgeführt. Dieser weist zudem noch zwei Nebeneffekte auf. Zum einen wird dadurch überprüft, ob das Protein trotz der Immobilisierung auf der Oberfläche seine native Faltung erhalten hat und weiterhin fähig ist GTP zu binden. Zum anderen kann durch ein Fluoreszenz-markiertes GTP das Protein sichtbar gemacht werden.

Der Austausch an dem Protein konnte nicht schon vor der Ligation mit dem Oligonukleotid durchgeführt werden, da kein Fluoreszenz-markiertes GppNHp der passenden Wellenlängen zur Verfügung stand. Ein Austausch mit markierten GTP zu diesem Zeitpunkt hätte vermutlich eine langsame Hydrolyse des GTP zu GDP zur Folge, welche das Protein wieder inaktiviert und eine Bindung von *downstream*-Effektoren verhindert hätte.

Das Versuchsschema ist in Abb. 3.17 gezeigt. Dabei wird die zuvor mit Blockmilch blockierte Oberfläche mit den Ypt-DNA-Konjugaten inkubiert. Nach erfolgter Immobilisierung und einem Waschschrift, wird der Austausch durch Zugabe von GTP-ATTO gestartet. Der Puffer ist dabei GDP-frei und enthält neben dem im starken Überschuss vorliegenden Fluoreszenz-markierten GTP noch EDTA, um das stabilisierende Mg^{2+} -Ion aus der Bindungstasche des Proteins zu maskieren.

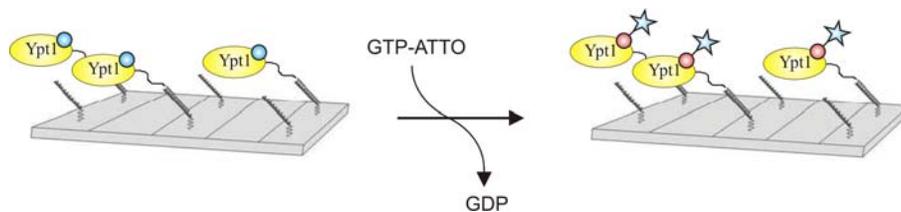


Abb. 3.17: Versuchsaufbau des GDP-GTP-Austauschs an Ypt1 auf dem festen Träger.

In der Abb. 3.18 (A) ist ein Fluoreszenzscan nach erfolgtem Austausch an Ypt1-Cys-Oligonukleotid-A gezeigt. Es ist ein deutliches spezifisches Signal für die Sequenz A zu sehen. Für die Sequenzen B, C, und E ist keinerlei Signal zu detektieren. Es wird ein Signal zu Rausch-Verhältnis von 5:1 erhalten.

Das zeigt eindeutig, dass die Proteine auch nach Ligation und Reinigung und der Immobilisierung auf dem DNA-Mikroarray ihre native Faltung behalten haben und fähig sind in ihre aktive Form überführt zu werden.

3. Ergebnisse

Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluss die Konzentration des eingesetzten Konjugates (**C**) und die Immobilisierungsdauer (**B**) auf das Experiment haben.

Im Fall der Dauer der Immobilisierung wurden vier verschiedene Zeiten getestet: 27 h, 6 h, 4 h und 2 h. Es zeigt sich nach 4 Stunden mit einem Signal zu Rausch-Verhältnis von 7:1 das beste Ergebnis. Eine Erhöhung auf 6 h Inkubationszeit hat keinen weiteren Einfluss mehr auf das Signal. Eine Erhöhung der Inkubationszeit auf 27 h zeigt mit einem S/N-Verhältnis von 4 eine Abschwächung des erhaltenen Signals. Vermutlich wurde durch die sehr lange Inkubationszeit bei RT das Ypt1 teilweise denaturiert und ein effektiver GDP-GTP-Austausch erschwert.

Auch im Falle der unterschiedlichen Konzentrationen (**C**) zeigt sich von 4,9 μM hin zu 9,8 μM eine klare Steigerung der Signalstärke mit einem S/N-Verhältnis von 8:1. Eine Erhöhung der eingesetzten Konzentration auf 29,4 μM führte zu einer leichten Abschwächung des Signals. Entweder ist durch eine Steigerung der Konzentration keine weitere Steigerung der Signalstärke mehr zu erreichen, oder bei der Probenvorbereitung ist beim Konzentrieren im Ultrafiltrationsröhrchen durch unspezifische Bindung an die Membran Material verloren gegangen.

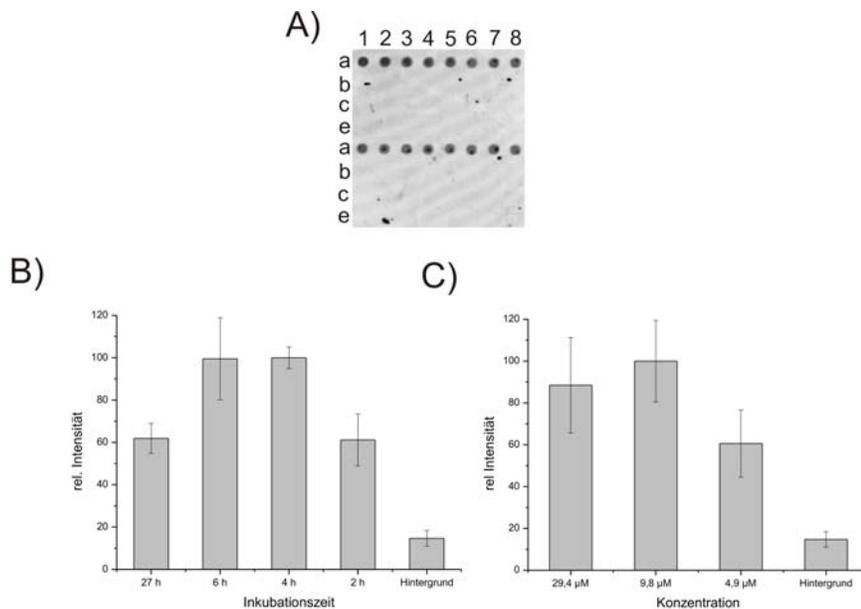


Abb. 3.18: GDP-GTP-ATTO-633-Austausch an immobilisierten Ypt1 (A). Abhängigkeit der Signalstärke von der Immobilisierungsdauer (B) und der eingesetzten Konzentration des Konjugates (C).

Auch im Fall des GDP-GTP-Austausches wurde zu Vergleichszwecken eine Immobilisierung des Ypt1 über Lysin-Seitenketten auf eine NHS-aktivierte Oberfläche vorgenommen. Die eingesetzten Konzentrationen gingen dabei von 170 μM bis 2 μM .

Dabei wurde für die Konzentration von 170 μM ein S/N-Verhältnis von 50, für 45 μM von 33 und für die Konzentration von 2 μM ein S/N-Verhältnis von 10 erreicht. Das zeigt, dass auch durch die zufällig orientierte kovalente Immobilisierung ohne weitere Linker das Protein seine native Faltung wahren und in seine aktive Form überführt werden kann.

3.5 Bindungseigenschaften und Funktion der immobilisierten Ypt-Proteine

3.5.1 Verdrängung des Nukleotids aus der Bindungstasche durch Bindung eines GEF

Eine der größten Herausforderungen bei der Herstellung eines Protein-Mikroarrays ist der Erhalt der nativen Konformation der immobilisierten Proteine. Durch die Immobilisierung sollte das Protein nicht in seiner Aktivität oder Funktionsweise gestört werden. Auch darf der Zugang zu einer evtl. vorhandenen Bindungstasche oder einem aktiven Zentrum nicht blockiert sein.

Neben der Fähigkeit der Ypt-Proteine nach erfolgter Immobilisierung auf dem DNA-Mikroarray einen Nukleotidaustausch eingehen zu können, sollte weiterhin überprüft werden, ob sie fähig sind einen Bindungspartner erfolgreich zu binden.

Als Bindungspartner für das Ypt1 wurde das DSS4 ausgewählt, das Hefeanalogon zum Rab-GEF MSS4 (Itzen *et al.* 2007). DSS4 ist ein GEF für Ypt1 und Sec4, welches in nukleotidfreier Umgebung mit einer K_D von 1 nM an die Proteine bindet und dabei das in der Bindungstasche befindliche Nukleotid verdrängt. So wird der Austausch zwischen GDP und GTP durch das DSS4 katalysiert. In Anwesenheit von Nukleotid in der Umgebung steigt der K_D -Wert auf 20 μM für das Ypt1 bzw. 30 μM für das Sec4.

In der folgenden Abbildung (Abb. 3.19) ist das entsprechende Experiment veranschaulicht. An einem durch DDI auf einem DNA-Mikroarray immobilisierten Ypt1-DNA-Konjugat soll zunächst, wie beschrieben, der Nukleotidaustausch von GDP durch das Fluoreszenz-markierte GTP-ATTO 633 (Jena Bioscience) durchgeführt werden. Anschließend wird der Mikroarray in nukleotidfreiem Puffer mit DSS4 inkubiert. Wenn das Ypt1 fähig ist seinen GEF zu binden, sollte das Fluoreszenz-markierte Nukleotid aus der Bindungstasche entfernt werden und somit nach Waschen kein Fluoreszenz-Signal mehr zu detektieren sein. Als negativ-Kontrolle wurde ein ansonsten gleich behandelter Array ohne DSS4 in der Inkubationslösung verwendet.

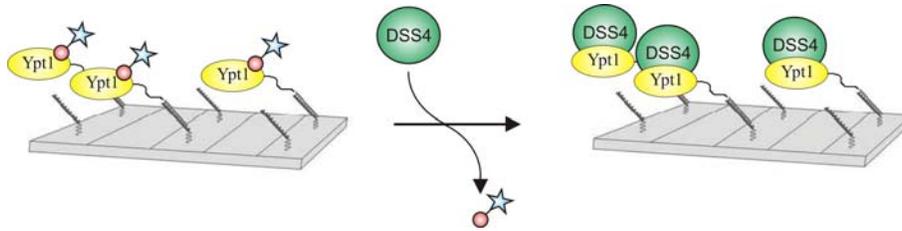


Abb. 3.19: Schema zur Versuchsdurchführung der Nukleotid-Verdrängung durch DSS4-Bindung an das immobilisierte Ypt1.

In der Abbildung 3.20 ist das Ergebnis des Experimentes gezeigt. Links zu sehen ist die erfolgreiche Verdrängung des Nukleotids aus der Ypt1-Bindungstasche durch die Bindung des DSS4. Es ist kein Fluoreszenz-Signal für die Sequenz A zu detektieren. Rechts, in der negativ-Kontrolle, ist das gewohnte, durch den GDP/GTP-ATTO Austausch hervorgerufene, Signal für die Sequenz A zu sehen, welches ohne Inkubation mit DSS4 nicht entfernt wurde. Allerdings ergab sich lediglich ein S/N-Verhältnis von 1,4, was verglichen mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen von bis zu 8 die Ungenauigkeit der Mikroarray-Experimente zeigt.

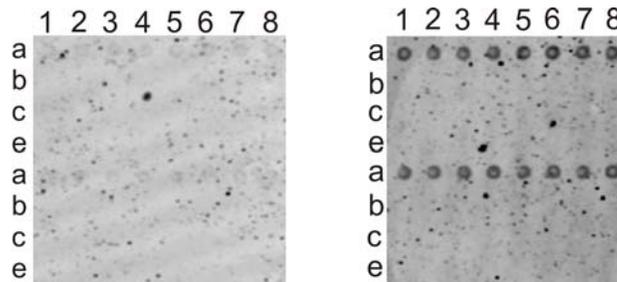


Abb. 3.20: Mikroarray-Experiment zur Nukleotid-Verdrängung an Ypt1 durch Bindung von DSS4. Links: Verdrängung durch DSS4; Rechts: negativ-Kontrolle durch Inkubation mit Puffer ohne DSS4.

3.5.2 Bindung von Cy5-markiertem DSS4 an immobilisiertes Ypt1

Das unter Abschnitt 3.5.1 beschriebene Experiment wurde nun umgekehrt. Das Experiment ist in der Abbildung 3.21 veranschaulicht. Dabei wurde zunächst ein Ypt1-DNA-Konjugat in seiner GDP-gebundenen inaktiven Form, wie in Abschnitt 2.9.4.1 beschrieben, auf dem DNA-Mikroarray immobilisiert.

Anschließend wurde der Array in nukleotidfreien Puffer mit Cy5-markiertem DSS4 inkubiert. Das DSS4 sollte das GDP aus der Bindungstasche Verdrängen und dabei an das Ypt1 binden. Es wurde ein Fluoreszenzsignal für die Sequenz A erwartet. Als negativ-Kontrolle wurde der Array mit Cy5-DSS4 bei 100 μM GDP im Puffer inkubiert.

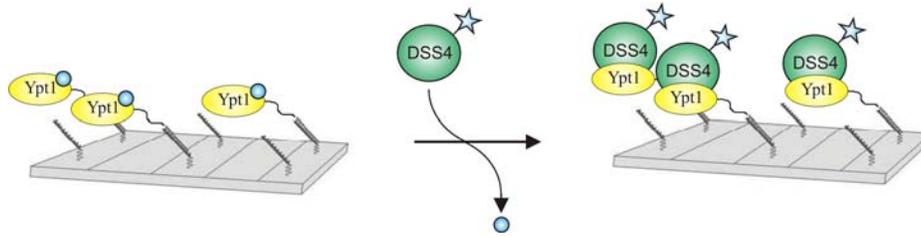


Abb. 3.21: Schema zur Versuchsdurchführung der Bindung von Cy5-markiertem DSS4 an immobilisiertes Ypt1.

In der Abbildung 3.22 ist der Fluoreszenzscan des Mikroarrays gezeigt. Links zu sehen ist die Inkubation mit Cy5-DSS4 in nukleotidfreiem Puffer, rechts die negativ-Kontrolle. Im Fall des nukleotidfreien Puffers ist ein deutliches spezifisches Signal für die Sequenz A mit einem S/N-Verhältnis von 1,2 zu detektieren. Also hat das DSS4 an das Ypt1 gebunden. In der negativ-Kontrolle ist nahezu kein Signal zu sehen, was darauf hindeutet, dass das Nukleotid im Puffer die Bindung des DSS4 an das Ypt1 verhindert hat.

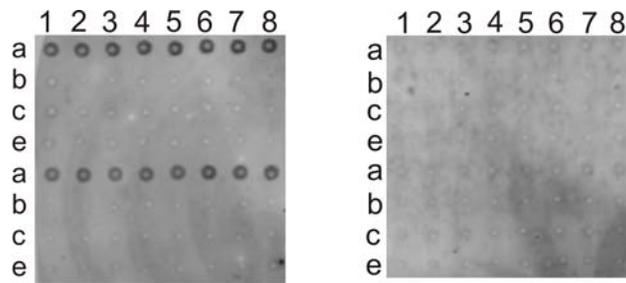


Abb. 3.22: Mikroarray-Experiment zur Bindung von Cy5-markiertem DSS4 an immobilisiertes Ypt1. Links: Bindung des GEF's. Rechts: negativ-Kontrolle mit 100 µM GTP im Puffer.

3.5.3 Selektivität der Bindung von DSS4 an immobilisiertem Ypt1

In Abschnitt 3.5.1 wurde gezeigt, dass das DSS4 unter nukleotidfreien Bedingungen spezifisch an Ypt1 binden und das Nukleotid aus der Bindungstasche entfernen kann. Im folgenden Experiment soll gezeigt werden, dass das DSS4 selektiv zwischen Ypt1 und anderen Ypt-Proteinen unterscheiden kann.

Die Durchführung des Experimentes ist in der Abbildung 3.23 veranschaulicht. Dabei werden zuerst Ypt1-Cys-Oligonukleotid-A und Ypt7-Cys-Oligonukleotid-C parallel, wie in Abschnitt 2.9.4.1 beschrieben, auf dem Mikroarray immobilisiert. Anschließend wurde der Array in nukleotidfreiem Puffer mit Cy5-markierten DSS4 inkubiert. Als positiv-Kontrolle für die parallele Immobilisierung des Ypt1 und Ypt7 diente ein Nukleotidaustausch von GDP durch GTP-ATTO 633, wie in Abschnitt 2.9.4.2 beschrieben.

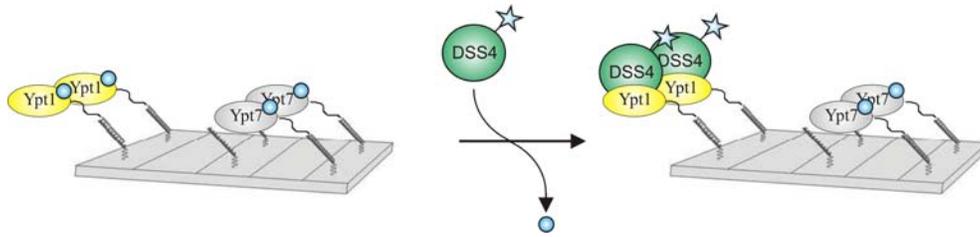


Abb. 3.23: Schema zur Versuchsdurchführung der Selektion des DSS4 zwischen Ypt1 und Ypt7 in einem Parallelexperiment.

Es ergibt sich auf dem resultierenden Fluoreszenzscan des Mikroarrays (Abb. 3.24 links) ein starkes Signal für die Sequenz A, dem Ypt1. Das S/N-Verhältnis beträgt in diesem Fall 1,8. Auch dieses Experiment verdeutlicht eine große Ungenauigkeit der Mikroarray-Experimente, da in dem ähnlichen Experiment unter Abschnitt 3.5.2 nur ein S/N-Verhältnis von 1,2 zu detektieren war. Für die Sequenz C ist keinerlei Fluoreszenz detektierbar. In der positiv-Kontrolle sind sowohl für das Ypt1, als auch für das Ypt7 in den Sequenzen A und C die Fluoreszenzsignale des markierten GTP sichtbar.

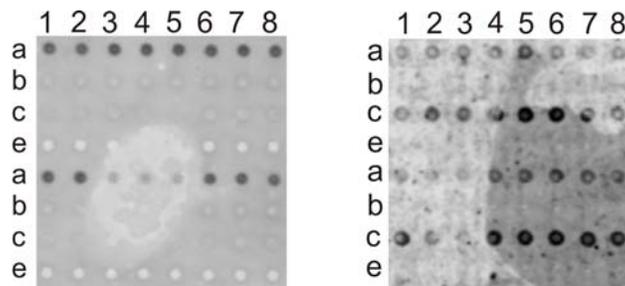


Abb. 3.24: Mikroarray-Experiment zur selektiven Unterscheidung des DSS4 zwischen Ypt1 und Ypt7. Links: Fluoreszenzscan der Cy5-DSS4-Bindung. Rechts: GDP-GTP-ATTO 633-Austausch zum parallelen Nachweis beider Proteine als positiv-Kontrolle.

3.6 Detektion der Bindung von DSS4 an Ypt1 auf dem Mikroarray durch MALDI-MS

Das gesetzte Ziel ist, neue Bindungspartner der Ypt-Proteine mithilfe von Massenspektrometrie nach erfolgter Immobilisierung auf einem DNA-Mikroarray zu identifizieren. Dafür mussten die Probenvorbereitung und die Messbedingungen optimiert werden. Dazu wurde das schon zuvor untersuchte Ypt1-DSS4-Bindungspaar verwendet.

Als Oberfläche für den Mikroarray diente hierbei ein Silizium-Chip. Dieser leitet den Strom, was zur Beschleunigung der entstehenden Ionen nach dem Übertritt in die Gasphase im

elektrischen Feld notwendig ist. Silizium-Chips verfügen über ähnliche Oberflächeneigenschaften wie Quarzglas und sind daher durch die selbe Chemie funktionalisierbar.

Die Immobilisierung des Ypt1-Cys-Oligonukleotid-F2 wurde analog zu Abschnitt 2.9.4.2 durchgeführt, gefolgt von der Bindung des DSS4 im nukleotidfreien Puffer, wie in Abschnitt 2.9.4.4 beschrieben. Nach erfolgter Bindung wurde der Array erst mit Puffer, dann mit Wasser gewaschen und an der Luft trocknen gelassen. Die als Matrix verwendete α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure war in Aceton (9,5 mg/ml) gelöst, damit sich der aufgetragene Tropfen schnell auf eine breite Oberfläche hin verteilte und ebenso schnell verdunstete. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Matrix dick genug war um im großen Überschuss mit dem DSS4 einen Mischkristall zu bilden, jedoch auch dünn genug um über die Laserpulse DSS4 mit in die Gasphase zu überführen.

Die immobilisierten Protein-DNA-Konjugate konnten nicht im Massenspektrum nachgewiesen werden (Becker *et al.* 2005). Gemessen wurde im „*linear positive mode*“ an einem Ultraflex TOF/TOF von Bruker Daltonics, wobei die eingesetzte Laserintensität etwa 23 % der verfügbaren Laserenergie von 107 μ J betrug.

In der Abbildung 3.25 (A) ist das erhaltene Spektrum gezeigt. Dabei sind die einfach bis dreifach positiv geladenen Signale von 16348, 8191 und 5464 m/z zu sehen, welche dem DSS4 entsprechen. In B ist das gemessene Spektrum, überlagert mit einem Vergleichsspektrum des DSS4, abgebildet, welches in der gleichen Matrix gelöst ebenfalls auf dem Silizium-Chip gemessen wurde. Dabei ist zu erkennen, dass die *Peak*-Maxima aus dem MALDI-Mikroarray-Experiment relativ zur positiv-Kontrolle hin zu höheren Massen verschoben sind. Außerdem sind die erhaltenen Signale wesentlich breiter, als bei der positiv-Kontrolle. In Abb. 3.25 (C) sind Vergrößerungen der einfach- und zweifach-geladenen Signale gezeigt. Die Verschiebung beruht vermutlich auf einer Reihe von Natrium-Addukten an das DSS4 durch die Probenvorbereitung.

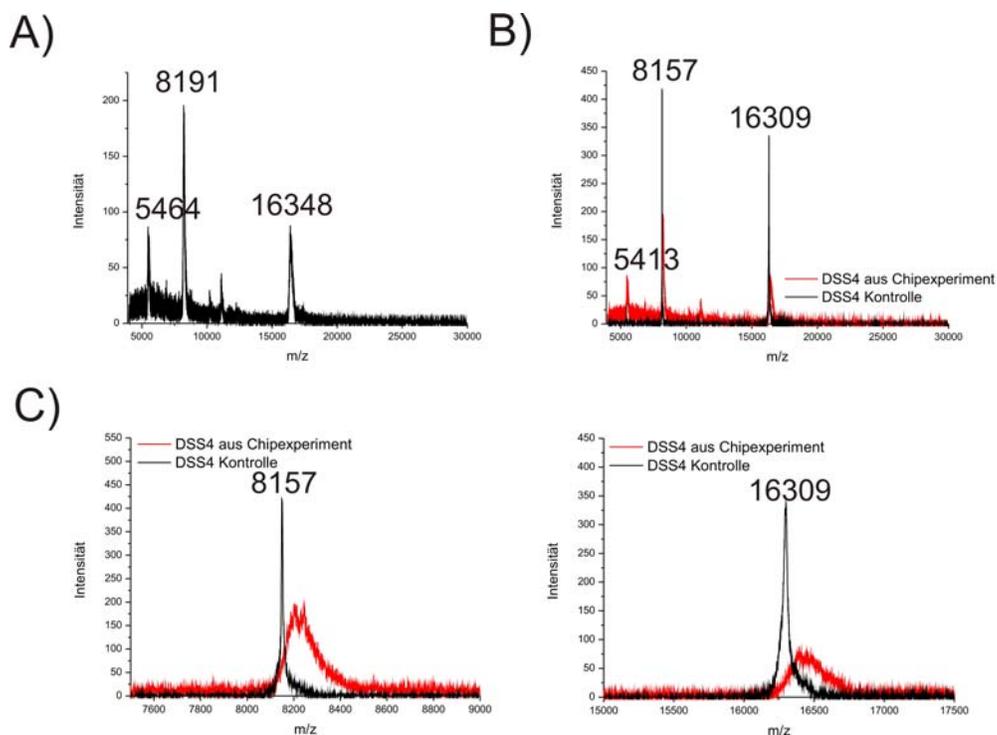


Abb. 3.25: Mikroarray-Experiment zur Bindung von DSS4 an Ypt1. Die Detektion erfolgte dabei mittels MALDI-MS. A: Spektrum des immobilisierten DSS4; B: Überlagerung des immobilisierten DSS4 mit einer DSS4 positiv-Kontrolle; C: Vergrößerung des einfach und des zweifach geladenen Signals zur Verdeutlichung der Peakverbreiterung und Verschiebung.

3.7 Strategie und Syntheschema zur Semisyntese der Thymidylat-Monophosphat-Kinase

Die Thymidylatmonophosphatkinase (TMPK) katalysiert die Phosphorylierung von Thymidinmonophosphat (TMP) zu Thymidindiphosphat (TDP) unter Verbrauch von ATP. Daher ist die TMPK essentiell bei der Synthese von Thymidintriphosphat (TTP), sowohl über den „Salvage“- als auch über den „De novo“-Weg. Das TTP wird dann z. B. für die DNA-Replikation benötigt.

Auch aus medizinischer Sicht ist die TMPK ein sehr interessantes Enzym, da sie ebenfalls die Aktivierung von Vorläufer-Medikamenten gegen das HI-Virus katalysiert. So werden zum Beispiel Nukleotidanaloga, wie das 3'Azido-2',3'-dideoxythymidinmonophosphat (AZTMP) zum Diphosphat phosphoryliert. Dieses wird nach einem weiteren Phosphorylierungsschritt zum aktiven Triphosphat umgewandelt, welches dann während der Transkription in die Virus-DNA eingebaut wird und zum Kettenabbruch führt. Allerdings ist die Katalyse durch die TMPK im Vergleich zu anderen Nukleotidkinasen nur langsam und die Phosphorylierung von

AZTMP ist sogar noch langsamer als die von TMP (Lavie *et al.* 1998). Durch Untersuchungen der dreidimensionalen Struktur der menschlichen TMPK mit verschiedenen Substraten (Ostermann *et al.* 2000) konnte gezeigt werden, warum die TMPK zwischen seinem natürlichen Substrat TMP und AZTMP unterscheidet.

Durch die langsame Katalyse akkumuliert das AZTMP in der Zelle und wirkt toxisch. Gezieltes Austauschen einzelner Domänen der TMPK könnte einerseits die Reaktionsgeschwindigkeit der TMPK-Katalyse erhöhen und außerdem noch die Selektivität hin zum AZTMP verschieben.

Dazu ist es allerdings unabdingbar den genauen Mechanismus des Phosphorylgruppentransfers aufzuklären. Ein wichtiger Rest des Enzyms ist das Asp15 im *P-loop*, welcher die 3'-Hydroxygruppe bzw. die 3'-Azidogruppe des Nukleotids, vermittelt durch Wasser, koordiniert. Es ist zwar unklar, ob das Asp15 ein katalytischer Rest ist, jedoch haben Mutationsstudien gezeigt, dass ohne das Asp15 keinerlei enzymatische Aktivität mehr vorlag. Um festzustellen, ob das Asp15 nun ein katalytischer Rest ist, oder ob seine Seitenkette zur Koordination protoniert ist könnte statt dessen ein Asparaginsäureanalogon verwendet werden, wie zum Beispiel das L-Phosphono-Methylen-Alanin (Pma) oder seine fluoridierte Variante das L-Phosphono-Difluormethylen-Alanin (Pfa), welches durch seinen starken -I-Effekt der Fluoratome den pK_a -Wert der Seitenkette stark herabsenkt und unter physiologischen Bedingungen eine deprotonierte Phosphonogruppe vorliegt.

Um den beliebigen Austausch katalytischer Reste in der TMPK zu ermöglichen kann das Enzym durch Festphasenpeptidsynthese hergestellt werden. Da aber die Kinase mit einer Länge von 212 Aminosäuren keine effiziente Synthese zulässt, wurde eine Semisynthesestrategie entwickelt. Durch die Wahl des natürlich in der Proteinsequenz vorkommenden Cystein31 als Ligationsstelle kann somit die TMPK31-212 exprimiert werden und die TMPK1-30 durch Festphasenpeptidsynthese hergestellt werden. Dadurch ist es möglich die Positionen 1–30 des Proteins beliebig auszutauschen, was zum Beispiel den *P-loop* mit den Aminosäuren 13–16 umfasst (Abb. 3.26).

Durch eine native chemische Ligation können die beiden Segmente zur vollen Sequenz verknüpft werden. Dazu wird das Peptid TMPK1-30 an einem speziellen Harz synthetisiert, welches nach der Abspaltung einen C-terminalen α -Thioester am Peptid bildet.

Die TMPK31-212 soll in *E. coli* exprimiert werden. Dazu wird ein Konstrukt verwendet, welches zu Reinigungszwecken mittels Affinitätschromatographie N-terminal einen Hexahistidintag trägt, der durch eine Tev-Protease-Erkennungssequenz (ENLYFQ)

anschließend wieder entfernt werden kann. Dabei wird gleichzeitig das für die Ligation wichtige N-terminale Cystein freigesetzt.

Eine Rückfaltung der TMPK nach erfolgter Ligation soll aktives Enzym liefern, welches dann auf seine Umsatzgeschwindigkeit hin analysiert wird.

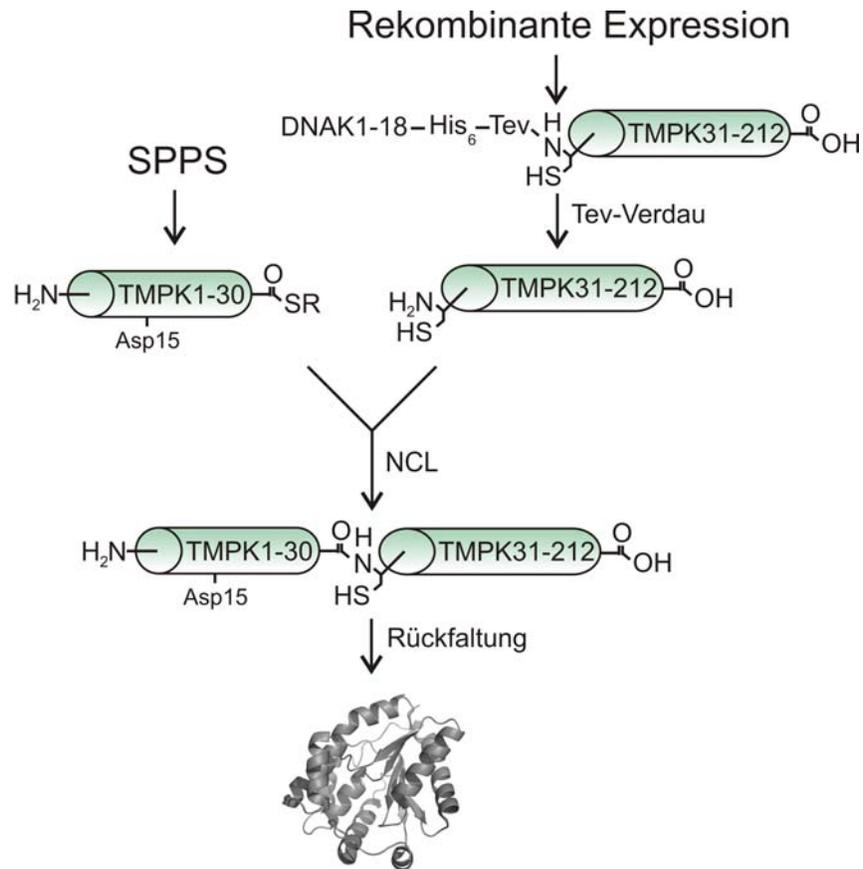


Abb. 3.26: Strategieschema zur Semisynthese der TMPK

3.8 Expression und Reinigung der TMPK31-212

3.8.1 Expression der TMPK

Die TMPK wurde zunächst über SapI- und BamHI-Schnittstellen in einen modifizierten pTXB1-Vektor kloniert. Zur Generierung der SapI-Schnittstelle wurden die Primer P1 und RPS09 verwendet. Die Basensequenz des DNAK-His₆-ENLYFQ-TMPK31-212-Fusionskonstruktes wurde durch Sequenzierung überprüft.

Die TMPK31-212 wurde in *E. coli* BL21(DE3)RIL-Zellen exprimiert. Dazu wurde 2TY-Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit der über Nacht bei 37°C gewachsenen

Vorkultur auf eine OD_{578} von ca. 0,06 angeimpft. Die Zellen wurden bei 37°C bis zur logarithmischen Phase einer OD_{578} von 0,6 wachsen gelassen und anschließend mit 1 mM IPTG induziert. Nach zwei Stunden Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (20 min, 4500 rpm) und im Mikrofluidizer lysiert.

In der Abbildung 3.27 ist eine SDS-PAGE zur Analyse der Expression gezeigt. Dabei ist in der Bahn 1 eine Zellprobe vor Induktion aufgetragen, in den Bahnen 2–4 jeweils eine Probe der Expression nach einer halben Stunde, nach einer bzw. zwei Stunden aufgetragen.

Schon nach einer halben Stunde entsteht im SDS-Gel eine neue sehr intensive Bande bei etwa 26 kDa welche dem überexprimierten TMPK-Fusionskonstrukt entspricht. Nach zwei Stunden ist die Expression vollständig abgeschlossen.

Das Pellet und der Überstand nach erfolgtem Zellaufschluss wurden ebenfalls mittels SDS-PAGE untersucht (Abb. 3.27). In der Bahn 5 ist dabei das Pellet aufgetragen, in der Bahn 6 eine Probe des Überstandes. Im Fall des Pellets zeigt sich eine sehr intensive Bande bei 26 kDa und einige schwächere Banden, welche Verunreinigungen entsprechen. Da die Probe des Überstands stark verdünnt ist, zeigt sich bei gleicher Verdünnung, verglichen mit der Probe des Pellets, keine Bande. Das Fusionskonstrukt wird vollständig in *inclusion bodies* exprimiert.

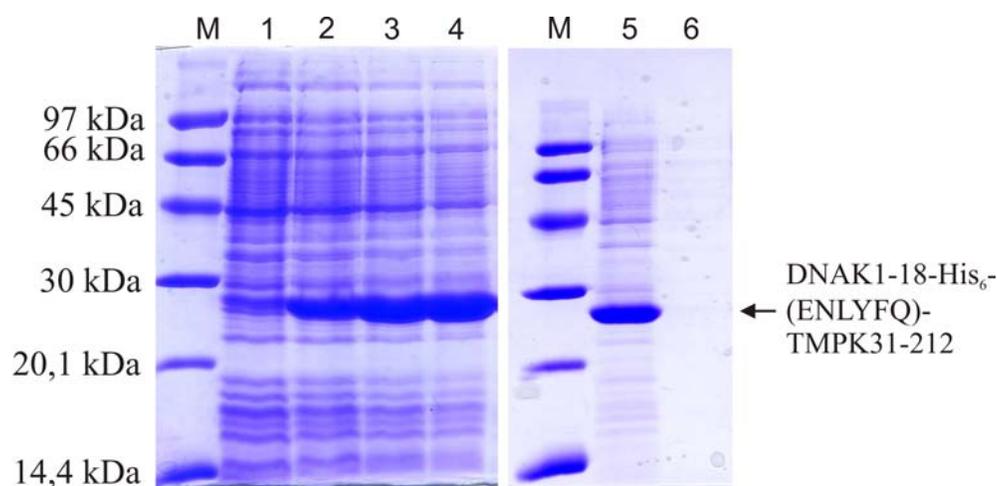


Abb. 3.27: SDS-Gel zur Analyse der Überexpression der TMPK31-212 in inclusion bodies. Bahn 1: vor Induktion; Bahn 2: 30 min; Bahn 3: 1 h; Bahn 4: 2 h; Bahn 5: Pellet nach Zellaufschluss; Bahn 6: Überstand nach Zellaufschluss.

3.8.2 Reinigung des exprimierten Fusionskonstruktes

3. Ergebnisse

Nach dem Zellaufschluss wurde das erhaltene Pellet mit Aufschlusspuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4), der 0,5 % Triton enthielt, gewaschen, um die Membranbestandteile herauszulösen. Nach erneuter Zentrifugation (25 min, 20000 rpm) wurde das Pellet noch einmal mit Aufschlusspuffer gewaschen, um Triton-Rückstände zu entfernen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet über Nacht mit Chaotrop-enthaltenden Puffer solubilisiert (8 M Gdn·HCl, 50 mM Tris pH 8,0).

Das solubilisierte Protein wurde wiederum zentrifugiert, um letzte unlösliche Bestandteile zu entfernen. Anschließend sollte es über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dazu wurde das Ni-Material zunächst mit Guanidinium-enthaltenden Puffer (8 M Gdn·HCl, 50 mM Tris pH 8,0) equilibriert, bevor das Fusionskonstrukt im langsamen Fluss (~ 2 ml/min) aufgetragen wurde.

Gewaschen wurde die Säule danach mit Auftragspuffer, welcher 25 mM Imidazol enthielt um etwaige unspezifische Bindungen an das Säulenmaterial zu unterbinden. Als letztes wurde die TMPK mit Hilfe von 250 mM Imidazol von dem Ni-Material eluiert.

In der Abbildung 3.28 (oben) ist das der Aufreinigung entsprechende SDS-Gel gezeigt. Bahn 1 zeigt dabei den Durchfluss des Auftrags, die Bahnen 2–4 die Waschfraktionen und die Bahnen 5 und 6 die Elutionsfraktionen.

In den Elutionsfraktionen ist dabei eindeutig eine starke Bande bei ca. 26 kDa zu sehen, welche dem gereinigten Fusionskonstrukt entspricht. Von den vereinigten und konzentrierten Elutionsfraktionen wurde anschließend zur Analyse ein LC-MS durchgeführt. Dieses ist in Abb. 3.28 unten gezeigt. Zu sehen ist das ESI-MS (links) und das dekonvolutierte Spektrum (rechts) des Fusionskonstruktes. Es sind die positiven Ladungen 13 bis 23 von 1893,6 bis 1070,6 m/z abgebildet. Nach Dekonvolution ergibt sich eine Masse von 24606 g/mol, welche sehr gut mit der berechneten Masse von 24607,9 g/mol für das Fusionskonstrukt ohne Methionin übereinstimmt.

3. Ergebnisse

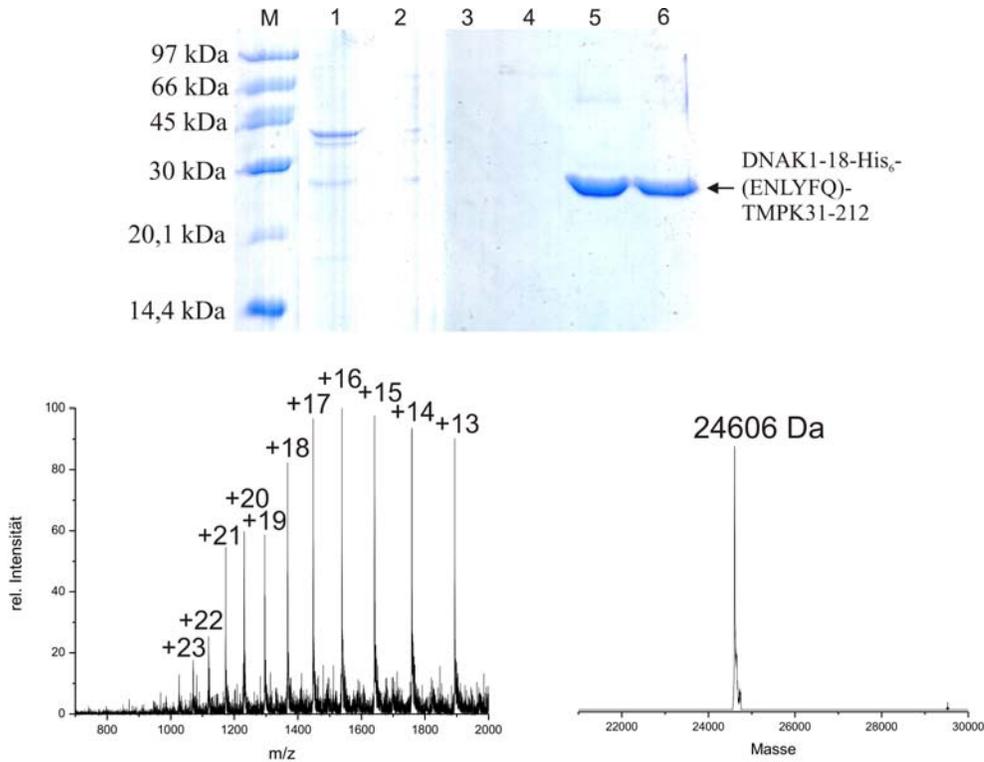


Abb. 3.28: SDS-Gel zur Analyse der Ni-NTA-Affinitätschromatographie (oben). Bahn 1: Durchfluss; Bahn 2–4: Waschfraktionen; Bahn 5–6: Elutionsfraktionen. Unten: ESI-MS des gereinigten Fusionskonstruktes (links). Dekonvolviertes Spektrum (rechts).

3.8.3 Tev-Verdau des gereinigten Fusionskonstruktes

Das isolierte Fusionskonstrukt DNAK1-18-His₆-(ENLYFQ)-TMPK31-212 wurde nun mit Tev-Protease verdaut (Tolbert und Wong 2002). Dadurch sollte der His₆-Tag entfernt werden und gleichzeitig an der TMPK31-212 ein N-terminales Cystein für die native chemische Ligation generiert werden. Dazu wurde die TMPK durch Dialyse in einen Puffer mit 4 M Harnstoff umgepuffert, welcher EDTA und Mesna enthielt, und Tev im Verhältnis 1:50 (w/w) hinzugegeben. Nun wurde durch langsame Dialyse die Konzentration an Harnstoff von 4 M hin zu 1,9 M verringert.

Dabei faltet sich die Tev-Protease ab etwa 2 M Harnstoff in ihre aktive Form zurück und die Proteolyse startet (Kapust *et al.* 2001). Sowohl das ungeschnittene, als auch das geschnittene Fusionskonstrukt fallen bei diesem Vorgang aus.

Die SDS-PAGE des Tev-Verdaus ist in Abb. 3.29 zu sehen (links) zu sehen. Dabei ist in der Bahn 1 das ungeschnittene Fusionskonstrukt aufgetragen, in den Bahnen 2 und 3 Proben des Verdaus nach 5 bzw. 7,5 h. In den Proben des Verdaus ist jeweils eine Doppelbande bei ca.

3. Ergebnisse

30 kDa zu sehen welche der eingesetzten Tev-Protease entspricht. Die Bande bei 45 kDa resultiert aus einer Verunreinigung der eingesetzten Protease. Die schwache Bande darüber ist eine leichte Verunreinigung aus dem Fusionskonstrukt. Außerdem entstehen zwei neue Banden bei ca. 21 und 6 kDa. Diese entsprechen der nun geschnittenen TMPK31-212 und dem abgeschnittenen Fragment DNAK1-18-His₆-(ENLYFQ). Nach 5 Stunden Verdau entsteht kein weiteres Produkt, da das übrige Fusionskonstrukt präzipitiert ist.

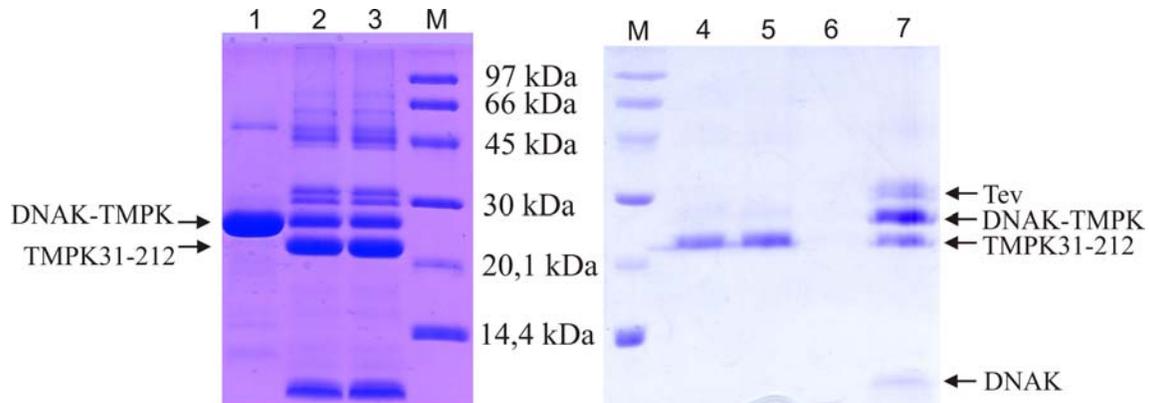


Abb. 3.29: SDS-Gel zum Tev-Verdau des gereinigten Fusionskonstruktes (links). SDS-Gel zur inversen Ni-NTA der TMPK-31-212 rechts). Bahn 1: ungeschnittenes Fusionskonstrukt; Bahn 2: Tev-Verdau 5 h; Bahn 3: Tev-Verdau 7,5 h; Bahn 4: Durchfluss inverse Ni-NTA; Bahn 5–6: Waschfraktionen; Bahn 7: Elutionsfraktion.

Nach erfolgtem Verdau wurde der Puffer mittels Dialyse gegen einen Guanidinium-enhaltenden Puffer ausgetauscht (6 M Gdn·HCl, 50 mM Tris pH 8,0). Durch den Pufferwechsel ging das Präzipitat wieder in Lösung. Die entstandene TMPK31-212 sollte nun durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dabei sollte die TMPK31-212 im Durchfluss der Säule eluieren. Das ungeschnittene Fusionskonstrukt, das geschnittene Fragment und die eingesetzte Tev-Protease, welche alle drei einen His₆-Tag tragen sollten auf der Säule verbleiben und erst bei 250 mM Imidazol eluiert werden können.

Das SDS-Gel zur Kontrolle über die Reinigung der TMPK31-212 ist Abb. 3.29 (rechts) gezeigt. Dabei ist in der Bahn 4 der Durchfluss und in den Bahnen 5–6 die zwei Waschfraktionen aufgetragen. Eine Probe der Elution wurde in der Bahn 7 analysiert.

Es ist im Durchfluss und in der ersten Waschfraktion eine Bande bei ca. 21 kDa zu sehen, welche der gereinigten TMPK31-212 entspricht. In der Elutionsfraktion sind neben einer Bande aufgrund unspezifisch gebundener TMPK31-212 noch drei weitere Banden zu sehen. Die der Tev-Protease, des ungeschnittenen Fusionskonstruktes und des geschnittenen DNAK-Fragmentes.

3. Ergebnisse

Die Produkt-enthaltenden Fraktionen wurden im Anschluss vereinigt und konzentriert. Zur Kontrolle des Reinheitsgrades der TMPK31-212 wurde eine RP-HPLC und ein ESI-MS durchgeführt.

Das HPLC-Chromatogramm ist in der Abb. 3.30 (links) gezeigt. Der Gradient verlief dabei von 5 % D in C hin zu 65 % D in C über 30 min. Der erste Peak in der HPLC entsteht durch die Injektion, das Signal bei 24,3 min entspricht dabei der TMPK31-212, was durch das ESI nachgewiesen ist (Abb. 3.30 rechts). Es zeigen sich die positiven Ladungen 11 bis 19 von 1871,8 bis 1082,6 m/z. Die nach Dekonvolution erhaltene Masse von 20556 g/mol stimmt sehr gut mit der berechneten Masse von 20555,5 g/mol überein.

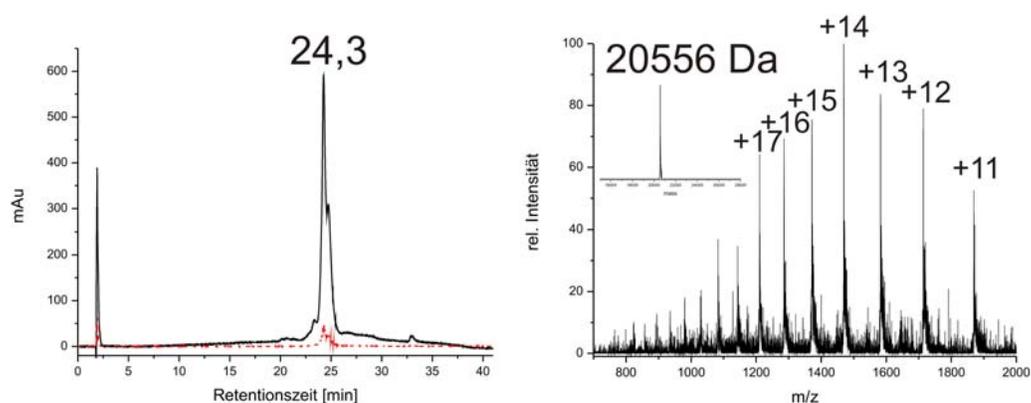


Abb. 3.30: HPLC-Chromatogramm der TMPK31-212 (links). Der Lauf wurde auf einer analytischen C4-Säule aufgenommen. Rechts: ESI-MS der TMPK31-212.

3.9 Synthese der TMPK1-30

1 H-MAARRGALIVLEGVDRAGKSTQSRKLVEAL-SR 30

M = 3384,8 g/mol

Die Synthese des N-terminalen Fragmentes 1-30 der TMPK erfolgte manuell im 0,2 mmol-Maßstab. Als Harz wurde ein spezielles Harz verwendet, welches nach der Abspaltung einen C-terminalen Thioester generiert (Hackeng *et al.* 1997). Es wurde zunächst mit β -Mercaptoethanol unter basischen Bedingungen behandelt, um die vorhandene Thiolgruppe am Harz zu entschützen. Die temporäre Boc-Schutzgruppe wurde jeweils mit reiner Trifluoressigsäure (TFA) abgespalten. Das TFA-Salz der nun freien N-terminalen Aminogruppe wurde mit Hilfe von N,N-Diisopropylethylamin (DIEA), welches zusammen

3. Ergebnisse

mit dem Aktivierungsreagenz HBTU hinzugefügt wird, *in situ* neutralisiert (Schnölzer *et al.* 1992).

Die Aminosäuren wurden entsprechend der angegebenen Sequenz gekoppelt, wobei die Kopplungszeit 12 min betrug. Die Kopplungen des Thr(Bzl) und des Arg(Tos) wurden jeweils zweimal durchgeführt, um die Kopplungseffizienz zu steigern. Die Kopplungsreaktion wurde stichprobenartig durch den Ninhydrintest (Sarin *et al.* 1981) auf ihre Vollständigkeit hin überprüft. Nach Kopplung der letzten Aminosäure wurde das entstandene Peptid durch wasserfreies HF vom Harz abgespalten, wobei alle permanenten Seitenschutzgruppen ebenfalls entfernt wurden (Tam und Merrieffield 1985). Um bei der Abspaltung gebildete reaktive Carbenium-Ionen abzufangen, wurde dem HF noch p-Cresol hinzugefügt (Miranda *et al.* 1998). Das abgespaltene Peptid wurde anschließend in Diethylether gefällt und nach Filtration im Vakuum in Acetonitril/Wasser 50:50 mit 0,1 % (v/v) TFA aufgenommen. Danach wurde es lyophilisiert.

Zur Aufreinigung wurde das Peptid in 6 M Guanidinium-enthaltenen Puffer aufgenommen und über eine präparative C4-Säule gereinigt. Dadurch wurden 32 mg des Peptids erhalten, was bezogen auf den Synthesemaßstab einer Ausbeute von 4,7 % entspricht.

Zur Analyse der Reinheit des isolierten Peptids wurde ein HPLC-Lauf auf einer analytischen C4-Säule vorgenommen. Dabei verlief der Gradient von 5 % D in C hin zu 65 % D in C über 30 min. Das dazugehörige Chromatogramm ist in Abb. 3.31 (links) angegeben. Der erste Peak im Chromatogramm entsteht durch die Injektion, der Peak bei 17,6 min ist die gereinigte TMPK1-30. Das ESI-MS (rechts) des Peaks zeigt drei positive Ladungen von 1692,5 bis 847 m/z. Die nach Dekonvolution erhaltene Masse von 3384,6 g/mol stimmt sehr gut mit der berechneten Masse der TMPK1-30-SR von 3384,8 g/mol überein.

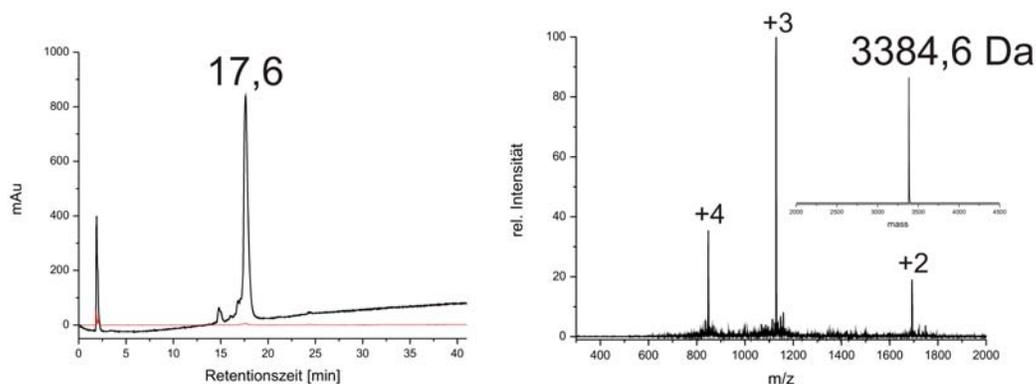


Abb. 3.31: HPLC-Chromatogramm der gereinigten TMPK1-30 auf einer analytischen C4-Säule (links). Rechts: ESI-MS der TMPK1-30.

3.10 Synthese der Biotin-Tev-TMPK1-30

Biotin-GG-ENLYFQ-MAARRGALIVLEGVDRAGKSTQSRKLVEAL-SR 30

M = 4836,4 g/mol

Als eine mögliche Methode zur Reinigung des Ligationsproduktes TMPK1-212 wurde eine N-Biotin-modifizierte TMPK1-30 synthetisiert. Dazu wurde die TMPK1-30 im 0,1 mmol Maßstab, wie in Abschnitt 2.10.5 beschrieben, über Boc-Festphasensynthese synthetisiert. Auch in diesem Fall wurde das spezielle Harz verwendet, welches bei der Abspaltung des Peptids einen C-terminalen Thioester bildet.

Nach erfolgter Kopplung bis zur Position TMPK-1 wurde N-terminal die Tev-Protease-Erkennungssequenz und ein kurzer Linker, bestehend aus zwei Glycinen, gekoppelt. Zur Kopplung des N-terminalen Biotins wurde ein Baustein verwendet, welcher eine kurze PEG-Kette besaß, die die Löslichkeit erhöhte und zusätzlich noch als Linker fungierte (Abb. 3.32). Die Carboxy-Funktion der PEG-Einheit wurde ebenfalls über HBTU aktiviert. Zur Synthese wurden 5 eq. Biotin bezogen auf den Synthesemaßstab verwendet. Die Kopplungszeit des Biotins betrug 2 h und wurde einmal wiederholt.

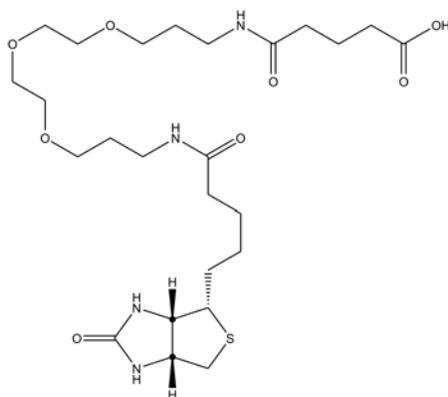


Abb. 3.32: Zur Synthese verwendeter Biotin-Baustein.

Nach erfolgter Synthese des Peptids, wurde es in trockener HF bei Anwesenheit von p-Cresol vom Harz abgespalten, in Diethylether gefällt und nach Filtration in MeCN/H₂O 70:30 mit 0,1 % (v/v) TFA aufgenommen und lyophilisiert.

3. Ergebnisse

Da die Hydrophobizität des Peptids durch das gekoppelte Biotin und die Tev-Protease-Erkennungssequenz verglichen mit der TMPK1-30 stark erhöht ist, wurde es zur Aufreinigung in reiner TFA gelöst. Es wurde eine präparative RP-C4-Säule zur Reinigung verwendet. Dabei wurde das Peptid bei 15 % D in C auf die Säule aufgetragen. Dadurch wurden etwa 2,5 mg Peptid erhalten, was bezogen auf den Synthesemaßstab einer Ausbeute von 0,5 % entsprach.

Im HPLC-Chromatogramm (Abb. 3.33 links) ist zu sehen, dass trotz der schon sehr geringen Ausbeute immer noch Verunreinigungen vorlagen, die nicht abgetrennt werden konnten. Der an seiner Basis stark verbreitete Peak bei 22,3 min im Chromatogramm entspricht dem biotinylierten Peptid.

Im dazugehörigen ESI-MS (Abb. 3.33 rechts) sind zwei Serien zu sehen. Die Signale des dreifach- und vierfach-geladenen biotinylierten Peptids von 1612,9 bis 1210 m/z ergeben nach Dekonvolution ein Molekulargewicht von 4835,8 g/mol, was mit der berechneten Masse von 4836,4 g/mol gut übereinstimmt. Außerdem finden sich ein doppelt- und ein dreifach-geladener Peak von 1421 und 947,9 m/z, welche nach Dekonvolution eine Masse von 2840 g/mol ergeben. Diese stammt von einer nicht identifizierten Abbruchsequenz, während der Peptidsynthese. Da die Verunreinigung aber schon während einer Testabspaltung vor der Biotin-Kopplung vorlag, konnte sie kein Biotin enthalten. Bei einer nachfolgenden Aufreinigung der TMPK1-212 würde dieses Peptid nicht an die Streptavidinbeads binden und daher nicht stören. Deshalb wurde die Verunreinigung ohne weitere Anstrengungen zur Reinigung des Peptids in Kauf genommen.

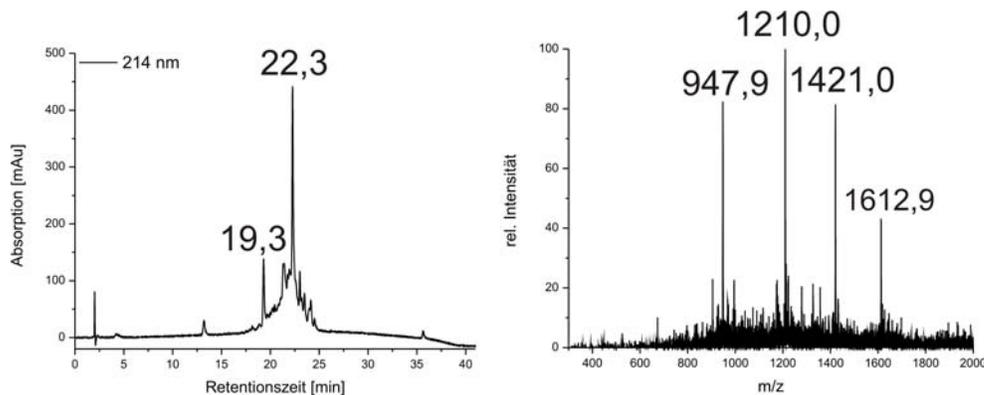


Abb. 3.33: HPLC-Chromatogramm der gereinigten biotinylierten TMPK1-30 mit Tev-Protease-Erkennungssequenz auf einer analytischen C4-Säule (links). Rechts: Das dazugehörige ESI-MS.

3.11 Native chemische Ligation der TMPK1-30 mit der TMPK31-212

Die Ligation der beiden TMPK-Fragmente 1-30 und 31-212 wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde die TMPK31-212 in 6 M Guanidinium pH 8,0 gelöst. Es wurde eine Konzentration von 100 μ M eingestellt. Anschließend wurden 5 moleq. des Peptids TMPK1-30 ebenfalls gelöst in 6 M Gdn·HCl hinzugefügt. Als Ligationsvermittler diente 1 % (v/v) Thiophenol. Die Ligation wurde bei RT für 12 h gerührt.

Danach wurde die Ligationlösung verdünnt und 20 min mit 20 % (v/v) β -Mercaptoethanol bei RT behandelt, um die Reaktion zu quenchen und die entstandenen Disulfide des Thiophenols zu lösen.

Eine Analyse der Ligation mittels SDS-PAGE ergab eine Ausbeute für das Ligationsprodukt von 56 %. Das entsprechende SDS-Gel ist in der Abb. 3.34 gezeigt. Dabei ist in der Bahn 1 die TMPK31-212 aufgetragen, in der Bahn 2 die Ligationmischung. Im Fall der Ligationmischung ist eine neue Bande bei ca. 28 kDa zu sehen, welche dem Ligationsprodukt entspricht.

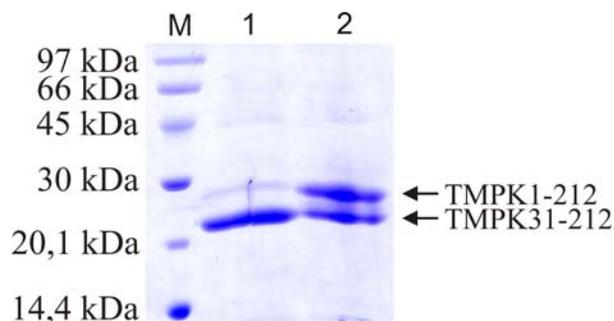


Abb. 3.34: SDS-Gel zur Analyse der Ligation TMPK1-30 mit TMPK31-212. Bahn 1: TMPK31-212; Bahn 2: Ligationmischung.

Die Analyse der Ligation durch RP-HPLC ist in der Abbildung 3.35 zu sehen. In **A** zu sehen ist eine Probe vor Beginn der Ligation. Dabei eluiert das Peptid TMPK1-30 bei 18,0 min von der analytischen C4-Säule, die TMPK31-212 bei 24,1 min.

Nach erfolgter Ligation und Aufarbeitung ist deutlich zu sehen, dass sich das Verhältnis der Peakflächen der beiden Fragmente zueinander deutlich geändert hat (**B**). Allerdings ist kein neuer Peak während der Ligation entstanden. Eine Analyse des Peaks bei 24,5 min durch ESI-MS (**C**) zeigte, dass das Edukt TMPK31-212 und das Produkt TMPK1-212 bei gleichem Anteil an Puffer D von der Säule eluierte. Dabei entsteht der erste Peak im Chromatogramm

3. Ergebnisse

durch das Guanidinium, das Signal bei 5,4 min durch das β -Mercaptoethanol und das Signal bei 11,2 min durch das eingesetzte Thiophenol.

Im Massenspektrum sind zwei Serien zu sehen. Die erste Serie, bestehend aus den positiven Ladungen 12–23 von 1978,7 bis 1033,3 m/z, ergab nach Dekonvolution ein Molekulargewicht von 23737 g/mol, was gut mit der berechneten Masse des Ligationsproduktes von 23734,2 g/mol übereinstimmt. Die zweite Serie mit den positiven Ladungen 12–17 von 1716,6 bis 1212,3 m/z ergab nach Dekonvolution ein Molekulargewicht von 20590 g/mol, was in Näherung dem Edukt TMPK31-212 mit 20556 g/mol entspricht.

Zur Abtrennung des eingesetzten Thiophenols, β -Mercaptoethanols und des nicht umgesetzten Peptids wurde die Ligationmischung über eine RP-HPLC mit einer C4-Säule gereinigt und anschließend lyophilisiert.

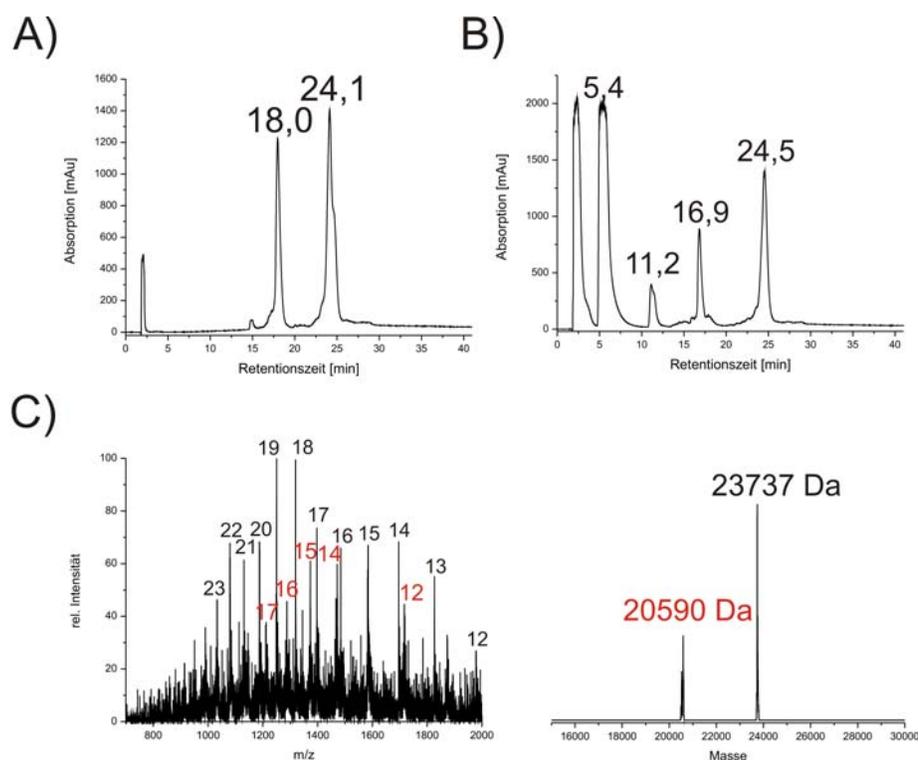


Abb. 3.35: Kontrolle der Ligation TMPK1-30 und TMPK31-212 durch RP-HPLC auf einer analytischen C4-Säule vor und nach erfolgter Ligation (A,B). Der Gradient verlief dabei von 5 % D in C hin zu 65 % D in C über 30 min. ESI-MS Charakterisierung des Peaks bei 24,5 min aus B (C).

3.12 Native chemische Ligation der Biotin-TMPK1-30 und TMPK31-212

Die NCL des biotinylierten TMPK1-30 Peptids war aufgrund seiner höheren Hydrophobizität wesentlich anspruchsvoller, als das Wildtyp-Fragment. Eine einfache Ligation mit 1 %

Thiophenol führte nicht zu einer effizienten Ligation. Daher wurde zur Optimierung ein intensives Screening durchgeführt. Dabei wurden verschiedenste Faktoren, wie zum Beispiel die Temperatur, der pH-Wert, die Konzentration oder der eingesetzte Ligationsvermittler variiert. Eine Übersichtstabelle der verschiedenen Bedingungen befindet sich im Anhang 7.9. Als beste Bedingungen mit einer Ausbeute von ca. 55 % stellten sich 200 eq. MPAA bezogen auf den die Biotin-TMPK1-30 heraus. Die Temperatur sollte 20°C betragen und der pH-Wert 7,2. Das eingesetzte Fragment TMPK31-212 muss dabei eine Konzentration von ca. 100 μM haben.

Die Analyse der Ligation mittels SDS-PAGE ist in Abb. 3.36 gezeigt. Dabei ist in der Bahn 1 die Ligationsmischung aufgetragen, in der Bahn 2 zum Vergleich die TMPK31-212.

Bei ca. 24 kDa ist eine neue Bande zu sehen. Allerdings ist diese Bande eine Doppelbande, hervorgerufen durch die in Abschnitt 3.10 beschriebene Verunreinigung des Biotin-TMPK-Peptids. Die Verunreinigung trägt ebenso, wie das erwünschte Peptid einen C-terminalen α -Thioester und kann daher ebenso durch eine NCL ligieren. Bei der sich anschließenden Aufreinigung des Ligationsproduktes über Streptavidinbeads könnte das Nebenprodukt allerdings durch einfaches Waschen entfernt werden, da es, wie schon erwähnt, kein Biotin trägt. Die Bande bei ca. 45 kDa und die schwächeren Banden höheren Molekulargewichts, sind Verunreinigungen aus der Präparation der TMPK31-212 und bestehen wahrscheinlich aus Cytochromen, welche Histidin-reich sind und daher schwer über Ni-NTA abzutrennen sind.

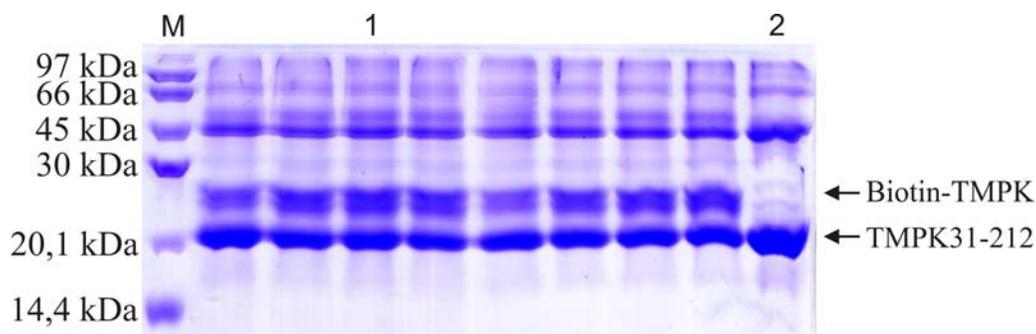


Abb. 3.36: SDS-Gel zur NCL zwischen der Biotin-TMPK1-30 und der TMPK31-212. Bahn 1: Ligationsmischung; Bahn 2: TMPK31-212.

3.13 Reinigung der TMPK1-212

Wie schon in Abschnitt 3.11 beschrieben, eluierte das Ligationsprodukt TMPK1-212 bei gleicher Prozentzahl D in C, wie das Edukt TMPK31-212. Es wurde verschiedensten

3. Ergebnisse

Ansätzen nachgegangen, um dieses Trennproblem zu umgehen, damit für nachfolgende Rückfaltungsversuche gereinigtes Edukt eingesetzt werden konnte.

So wurden verschiedene RP-HPLC Bedingungen getestet. Es wurden C4- C8- und C18-Säulen mit verschiedenen Puffersystemen bei unterschiedlichen Gradienten und Flussraten verwendet. Sämtliche getesteten Bedingungen führten zu keiner Trennung von Produkt und Edukt.

Auch HPLC-Größenausschlusschromatographie, isokratisch in 6 M Gdn·HCl-enthaltenden Puffer auf einer PW3000-Säule von Tosoh Biosep bei verschiedenen Flussraten, führte zu keinem Ergebnis.

Als nächstes wurde versucht Aldehyd-funktionalisierte Amino-PEGA-Beads (Villain *et al.* 2001) mit dem Ligationsprodukt zu inkubieren. In Abb. 3.37 ist ein Schema der Thioazolidin-Bildung gezeigt. Das Edukt TMPK31-212 mit seinem N-terminalen Cystein sollte dabei bei einem pH-Wert von ca. 4–5 spezifisch an die Beads binden und somit aus der Lösung herausgezogen werden, in der das Produkt verbleiben sollte. Aber auch diese Methode führte nicht zur Reinigung der TMPK.

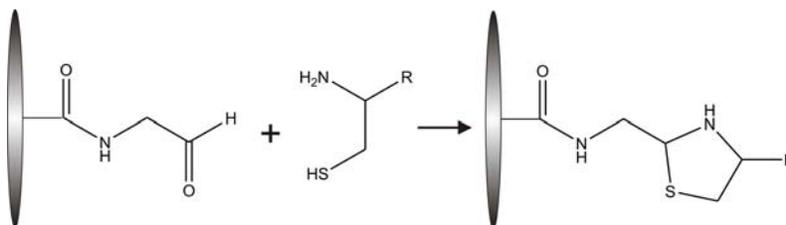


Abb. 3.37: Thioazolidin-Bildung durch das N-terminale Cystein der TMPK31-212 an Aldehyd-funktionalisierte Amino-PEGA-Beads.

Ein weiterer Ansatz zur Trennung von Edukt und Produkt der Ligation war die Modifizierung der TMPK1-30. So sollte auf das Peptid N-terminal eine Tev-Protease-Erkennungssequenz und ein kurzer Glycin-Linker synthetisiert werden (Abb. 3.38). Anschließend sollte ein Biotin-Baustein auf das modifizierte Peptid gekoppelt werden. So sollte nach erfolgter Ligation das Ligationsprodukt auf Streptavidinbeads spezifisch gebunden und das Edukt durch Waschen entfernt werden. Anschließend sollte die Tev-Protease diesen *Tag* wieder entfernen und die ligierte TMPK1-212 freisetzen.

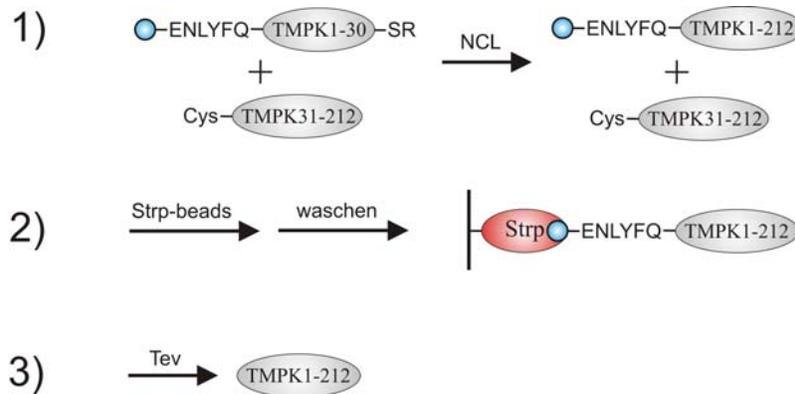


Abb. 3.38: Reinigung der TMPK1-212 über Streptavidinbeads. Dabei trägt die TMPK1-30-SR eine Tev-Protease-Erkennungssequenz und einen Biotin-Baustein (blau). Nach erfolgter Ligation bindet das Ligationsprodukt an die Streptavidinbeads und das nicht umgesetzte Edukt TMPK31-212 kann durch Waschen entfernt werden. Durch eine Tev-Proteolyse wird die TMPK1-212 freigesetzt.

Die Synthese des Biotin-markierten Peptids wurde in Abschnitt 3.10 und die Ligation mit der TMPK31-212 in Abschnitt 3.12 behandelt.

Zu Testzwecken wurde zunächst an Stelle des Ligationsproduktes lediglich das Peptid verwendet. Ein Ansatz in Lösung zeigte, dass die Tev-Protease das Peptid in einem 1,9 M Harnstoffpuffer bei einem Verhältnis von 5:1 (w/w) Peptid zu Tev nahezu quantitativ geschnitten hat. Das HPLC-Chromatogramm jeweils einer Probe vor Zugabe der Tev und nach 12 h Verdau sind in Abb. 3.39 (A) zu sehen. Der erste Peak in den beiden Chromatogrammen entsteht dabei jeweils durch den eingesetzten Harnstoff im Puffer. Im Fall der Probe vor Verdau ist ein Signal bei 21,4 min zu sehen, welches nach 12 h Verdau fast vollständig verschwunden ist. Dafür ist ein neues Signal bei ca. 17,0 min entstanden, welches gleichzeitig der TMPK1-30 mit hydrolysierten Thioester, als auch dem abgeschnittenen Biotinfragment entspricht.

Dies ist durch das ESI-MS verifiziert, welches von der Fraktion vorgenommen wurde (Abb. 3.39 B). Es findet sich eine Serie der positiven Ladungen 2–4 pro Molekül von 1599,1 bis 800,5 m/z, welche nach Dekonvolution eine Masse von 3196,6 g/mol ergibt, was mit der berechneten Masse von 3196,8 g/mol für die TMPK mit hydrolysierten Thioester sehr gut übereinstimmt. Außerdem ist noch ein Signal bei 1469,6 m/z zu detektieren, was dem einfach geladenen Biotin-Fragment entspricht (berechnet: 1469,7 g/mol). Die Serie von 2–4 positiven Ladungen pro Molekül von 1661,1 bis 831,3 m/z ergibt nach Dekonvolution eine Masse von 3320,6 g/mol und ist nicht zuzuordnen. Wahrscheinlich ist es das TMPK Peptid 1-30 mit einem modifizierten Thioester.

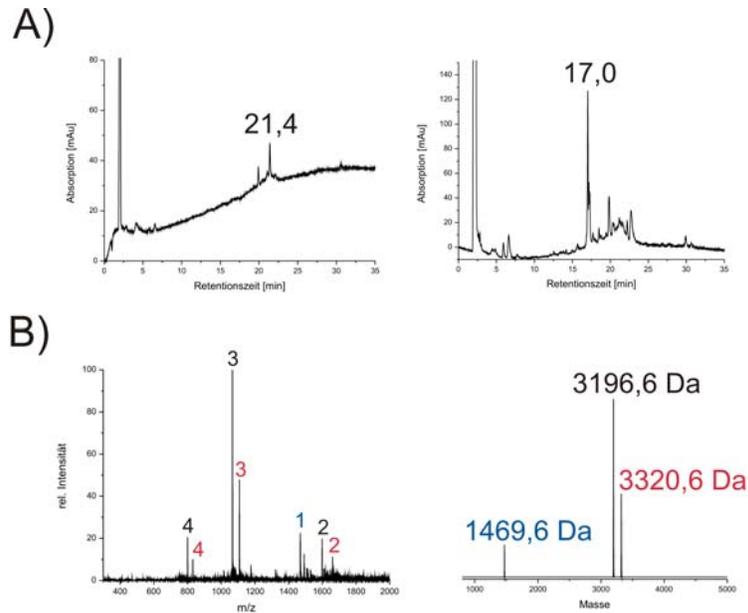


Abb. 3.39: RP-HPLC des Tev-Verdaus des Biotin-markierten Peptids TMPK1-30 (A). ESI-MS des Tev-Verdaus in Lösung (B).

Als nächstes wurde versucht die Ligationmischung des biotinylierten Peptids TMPK1-30 mit der TMPK31-212 über die Streptavidinbeads zu reinigen. Dazu wurde die lyophilisierte Ligationmischung nach HPLC in einen 4 M Harnstoffpuffer gelöst. Anschließend wurden die Streptavidinbeads, welche zuvor gewaschen und mit dem selben Puffer equilibriert worden sind, mit der Probe eine Stunde bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach wurden die *beads* erneut gewaschen. Daraufhin wurde die Tev-Protease im Verhältnis 5:1 (w/w) Protein zu Tev in 4 M Harnstoff gelöst zu den *beads* gegeben. Diese Suspension wurde über Nacht langsam gegen einen Puffer dialysiert, welcher nur noch eine 2 M Harnstoff-Konzentration hatte.

In der Abbildung 3.40 ist die Analyse des Experimentes mittels SDS-PAGE gezeigt. Dabei ist in der Bahn 1 eine Probe des Überstandes vor Inkubation auf den *beads* aufgetragen, in der Bahn 2 eine Probe des Überstandes nach der Inkubation. In der Bahn 3 ist der Überstand nach Waschen der *beads* gezeigt. Nach Zugabe der Tev und der erfolgten Proteolyse ist eine Probe des Überstandes in der Bahn 4 aufgetragen. Eine Probe der *beads* nach Proteolyse ist in Bahn 5 aufgetragen. Sie wurde durch Zugabe von 8 M Harnstoff zu den *beads* erhalten. In der Bahn 6 ist ebenfalls eine Probe der *beads* zu sehen, nach 10 minütiger Behandlung der *beads* mit 8 M Harnstoff und 2 x SDS-Probenpuffer bei 95°C.

Zwischen den Proben vor und nach Inkubation der Ligationmischung auf den *beads* ist kein Unterschied zu erkennen. Das würde entweder darauf hindeuten, dass nichts an die *beads*

3. Ergebnisse

gebunden hat, oder dass das auf den *beads* immobilisierte Streptavidin durch den Harnstoff im Puffer (4 M) teilweise denaturiert war und die Bindungskapazität der *beads* dadurch stark erniedrigt wurde. Dass die *beads* stark überladen waren kann ausgeschlossen werden, da eine ausreichende Menge an *beads* verwendet wurde. Nach 3maligen Waschen der *beads* ist im Überstand kein Protein mehr zu detektieren.

Die Proben des Überstandes und der *beads* nach erfolgter Proteolyse (Bahn 4–5) sind neben der Coomassie-Färbung auch nach Silberfärbung abgebildet (rechts). Dort ist zu sehen, dass sich im Überstand kaum Tev-Protease befindet, währenddessen sich auf den *beads* eine größere Menge der Protease befindet. Dies deutet auf eine unspezifische Immobilisierung oder eine Aggregation der Tev auf den Streptavidinbeads hin.

Erstaunlich ist, dass sowohl im Überstand, als auch auf den *beads* noch größere Mengen an TMPK31-212 zu sehen sind, welche kein Biotin tragen und somit nicht auf den *beads* immobilisiert werden sollten. Auch die Bande auf Höhe des Ligationsproduktes war immer noch eine Doppelbande, so dass die vorher erwähnte Verunreinigung des biotinylierten Peptids und damit auch der Ligationsmischung ebenfalls unspezifisch an die *beads* gebunden hat.

Es konnte durch ESI-MS nicht verifiziert werden, ob sich im Überstand das Ligationsprodukt Biotin-(ENLYFQ)-TMPK1-212 befand oder die von der Tev geschnittene TMPK1-212.

Durch die Aggregation oder unspezifische Bindung der Tev an die Streptavidinbeads lässt sich allerdings vermuten, dass die Proteolyse nicht erfolgreich war.

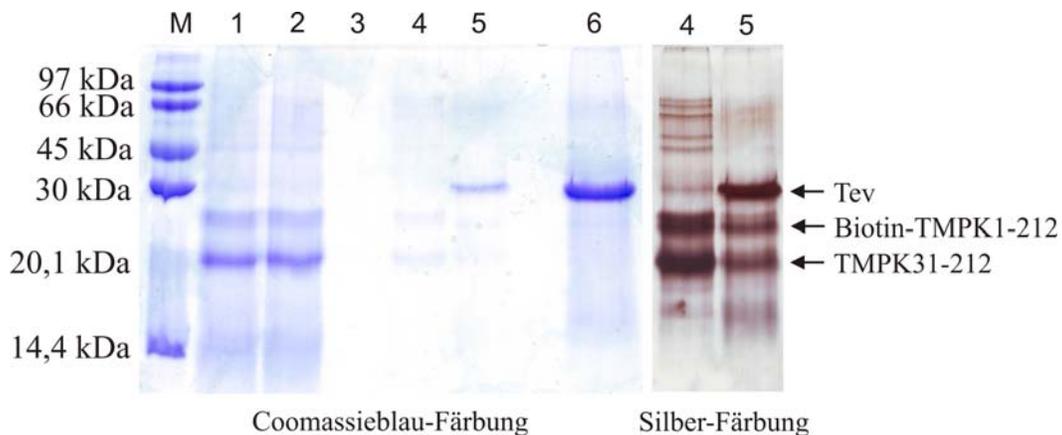


Abb. 3.40: SDS-Gel zur Analyse der Reinigung der TMPK1-212 mithilfe der Streptavidinbeads. Bahn 1: Überstand vor Inkubation der *beads*; Bahn 2: Überstand nach erfolgter Inkubation; Bahn 3: Überstand nach Waschen der *beads*; Bahn 4: Überstand nach erfolgter Tev-Proteolyse; Bahn 5: *Beads* nach erfolgter Proteolyse; Bahn 6: *beads* nach Proteolyse unter harscheren Bedingungen. Die Bahnen 4 und 5 sind in der Coomassie- und in der Silberfärbung gezeigt.

Zuletzt wurde eine Reinigung der TMPK mittels Dialyse untersucht. Dazu wurde die Ligationmischung über HPLC auf einer RP-C4-Säule von Thiophenol und β -Mercaptoethanol getrennt und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde dann in Chaotrop-enthaltenden Puffer gelöst (6 M Gdn-HCl, 50 mM Tris pH 8,0).

Diese Lösung wurde in einem Verhältnis von 1:1000 gegen einen Puffer dialysiert, der neben DTT für reduktive Bedingungen auch die beiden Substrate der TMPK ATP und TMP enthielt (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 100 μ M ATP, 100 μ M TMP, 50 mM Tris pH 7,5).

Während der 12 stündigen Dialyse bei 4°C präzipitierte das Edukt TMPK31-212, wobei das Ligationsprodukt TMPK1-212 weitestgehend in Lösung blieb. So konnte nach erfolgter Ligation und Reinigung durch Dialyse eine Ausbeute von 30 % bezogen auf die TMPK31-212 erhalten werden. Zur Steigerung der Ausbeute konnte dieser Schritt mit während der Dialyse ausgefallenem Produkt wiederholt werden.

3.14 Expression und Reinigung der Wildtyp-TMPK1-212

Zur Expression der Wildtyp-TMPK wurde ein pGEX-Vektor verwendet, welcher die Kinase als Fusionskonstrukt mit der Glutathiontransferase und einer Thrombin-Schnittstelle codierte. Dazu wurde die Expressionskultur mit der über Nacht bei 37°C gewachsenen Vorkultur von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen auf eine OD von ca. 0,1 angeimpft und bei 37°C im Schüttler inkubiert. Bei einer OD von etwa 0,8 wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert.

Nach 4 h Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 min, 4500 rpm) geerntet. In Abb. 3.41 (links) ist das SDS-Gel zur Kontrolle über die Expression abgebildet. Dabei ist in der Bahn 1 eine Probe vor Induktion, in der Bahn 2 eine Probe nach erfolgter Expression aufgetragen. Es ist eine leichte Überexpression bei ca. 48 kDa zu sehen.

Nach dem Ernten der Zellen wurden sie zwei mal im Mikrofluidizer aufgeschlossen und anschließend das Protein über Glutathion-Sepharose gereinigt. Dazu wurden die GSH-Beads zunächst mit 5 SV PBS-Puffer equilibriert und dann das Zelllysate im langsamen Fluss (~2 ml/min) bei 4°C auf die *beads* aufgetragen. Nach dem Waschen mit 10 SV PBS-Puffer wurden die *beads* mit 2 SV PBS-Puffer mit 5 mM DTT und 125 μ g/ml Thrombin (59 u/mg) versetzt und anschließend bei 4°C 12 h geschwenkt. Dann wurde die wtTMPK mit 7,5 SV von der Säule eluiert.

In Abb. 3.41 (rechts) ist das SDS-Gel zur Kontrolle über die Reinigung der wtTMPK gezeigt. Dabei ist in der Bahn 3 der Durchfluss, in den Bahnen 4–5 zwei Waschfraktionen und in den

Bahnen 6 bis 8 die Elutionsfraktionen aufgetragen. In den Elutionsfraktionen ist eine prominente Bande bei ca. 28 kDa zu sehen, welche der wtTMPK entspricht.

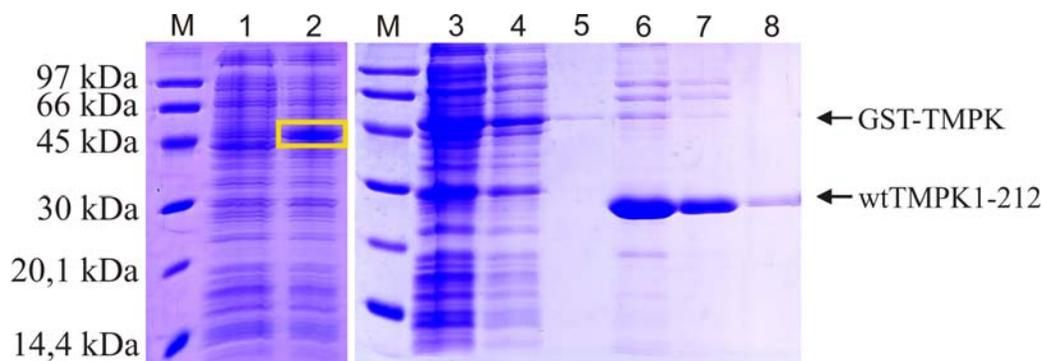


Abb. 3.41: SDS-Gel zur Kontrolle der Expression und Aufreinigung der wtTMPK über GSH-beads. Bahn 1: Probe vor Induktion; Bahn 2: Probe nach erfolgter Expression; Bahn 3: Durchfluss der Aufreinigung; Bahn 4–5: Waschfraktionen; Bahn 6-8: Elutionsfraktionen.

3.15 Analyse des Reinheitsgrades der wtTMPK und der semisynthetisch hergestellten TMPK

Zur Analyse der Reinheit der erhaltenen wtTMPK und der semisynthetisch hergestellten TMPK wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (Abb. 3.42 A). Dabei ist in der Bahn 1 eine Probe der gereinigten wtTMPK aufgetragen, in der Bahn 2 die semisynthetisch hergestellte TMPK. Im Fall des Wildtyps findet sich eine deutliche Bande bei etwa 28 kDa, welche dem Enzym entspricht. Es sind noch zwei schwache Verunreinigungen bei ca. 66 kDa zu sehen, welche nicht identifiziert werden konnten. Im Fall der semisynthetisch hergestellten TMPK findet sich ebenfalls eine deutliche Bande bei ca. 28 kDa. Allerdings ist immer noch eine schwache Bande bei ca. 23 kDa zu sehen, welche dem Edukt der Ligationsreaktion entspricht. Die diffuse Bande bei etwa 4 kDa ist TMPK1-30, die durch die Dialyse mit einer Membran von einem 8 kDa_{cutoff} nicht abgetrennt werden konnte.

In Abb. 3.42 B ist das entsprechende MALDI-MS zur semisynthetischen TMPK zu sehen. Es gibt ein deutliches Signal bei 23733 m/z, was sehr gut mit der berechneten Masse der TMPK von 23734,2 g/mol übereinstimmt. Außerdem sind noch die 2 x bzw. 3 x geladenen Signale bei 11851 und 7916 m/z zu sehen.

In C ist das ESI-MS der wtTMPK abgebildet. Es finden sich die positiven Ladungen 13–22 pro Molekül von 1848,2 bis 1090,6 m/z. Nach Dekonvolution ergibt sich ein

3. Ergebnisse

Molekulargewicht von 24015 g/mol, was sehr gut mit dem berechneten Molekulargewicht von 24015 g/mol für das Konstrukt übereinstimmt.

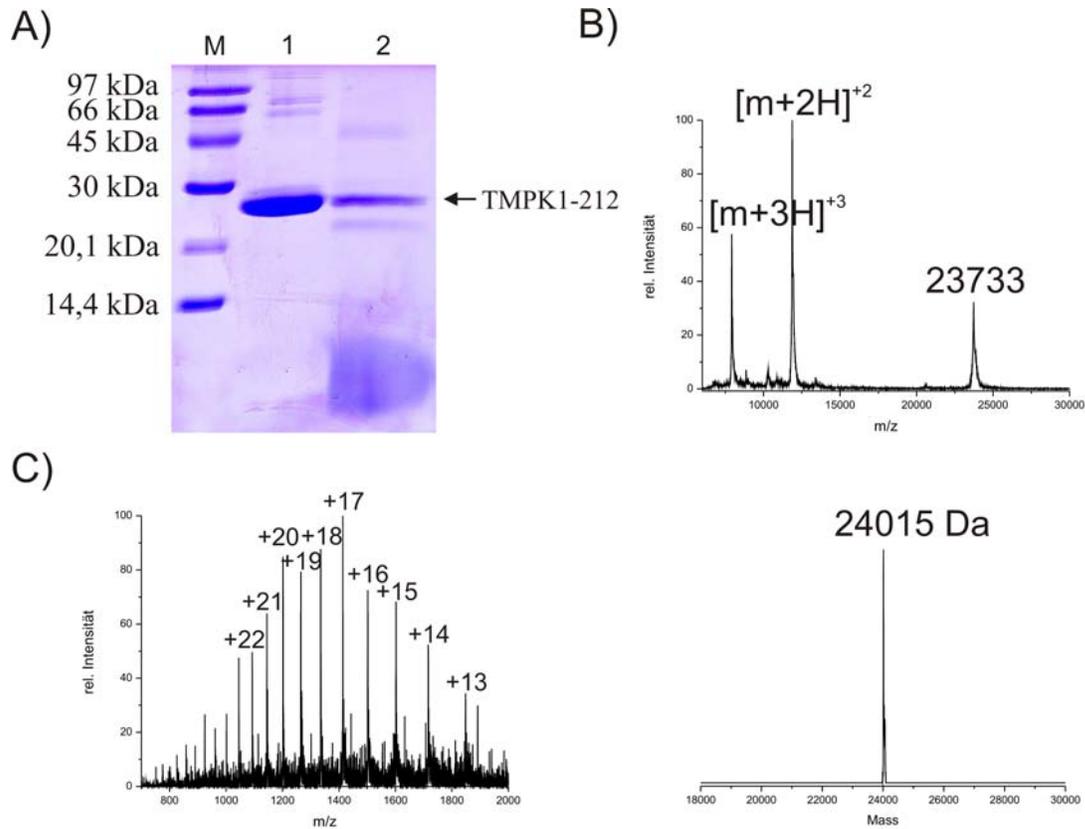


Abb. 3.42: SDS-Gel zur Charakterisierung der Reinheit der wtTMPK und der semisynthetisch hergestellten TMPK (A). Bahn 1: wtTMPK; Bahn 2: semisynthetische TMPK. B: MALDI-MS der semisynthetischen TMPK. C: ESI-MS des Wildtypkonstruktes.

3.16 Aktivitätsassay der wtTMPK

Zur Feststellung der Aktivität der exprimierten wtTMPK wurde der in Abschnitt 2.9.3 beschriebene gekoppelte Enzymtest durchgeführt. Dabei wurde die TMPK einmal in ihrer nativen Form nach Expression und Isolierung getestet und einmal nach erfolgter Denaturierung, bzw. nach Rückfaltung des denaturierten Enzyms. Dazu wurde eine Probe der wtTMPK mit einem 6 M Gdn·HCl-Puffer auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml verdünnt und 6 Stunden bei RT geschwenkt. Nach einer, drei bzw. sechs Stunden wurde jeweils eine Probe für den Aktivitätsassay genommen. Nach sechs Stunden Denaturierung wurde das Enzym, wie in Abschnitt 2.8.6 beschrieben, zurück gefalten.

3. Ergebnisse

Die entsprechenden Ergebnisse des anschließenden Aktivitätsassays sind in Abb. 3.43 gezeigt. Dabei ist die Absorption bei 340 nm (normiert) gegen die Zeit aufgetragen. Es ergibt sich für die native wtTMPK eine Steigung von 0,0017 und damit eine k_{cat} von $0,91 \text{ s}^{-1}$.

Nach 1 h Denaturierung sind immer noch 30 % der Aktivität des Enzyms erhalten geblieben. Erst nach 3 h ist das Enzym durch Denaturierung vollständig inaktiviert worden. Für die Probe nach 6 Stunden gibt es keine weitere Veränderung. Die Probe nach Rückfaltung denaturierter TMPK ergibt exakt die gleiche k_{cat} , wie die ursprüngliche Kinase.

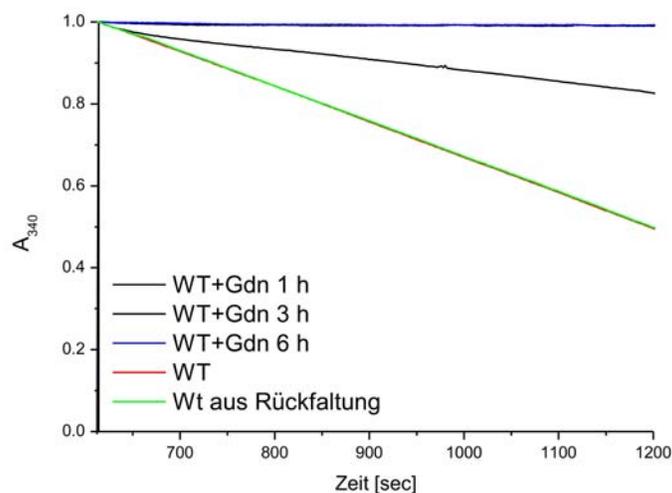


Abb. 3.43: Gekoppelter Enzym-Aktivitätsassay zur Bestimmung der TMPK-Aktivität vor Denaturierung, nach Denaturierung und nach Rückfaltung denaturierter TMPK.

Weiterhin wurden CD-Spektren von der TMPK vor und nach Denaturierung und nach erfolgter Rückfaltung denaturierter TMPK aufgenommen. Die Spektren sind in Abbildung 3.44 (links) zu sehen. Die Spektren der TMPK vor Denaturierung und nach erfolgter Rückfaltung unterscheiden sich dabei nur unwesentlich. Die Probe der TMPK nach 6 h Denaturierung zeigt zwar ein ähnliches Bild, weist jedoch mit einer molaren Eliptizität von $-70 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ bei 210 nm eine wesentlich geringere Intensität auf. Der verbliebene α -Helix-Charakter lässt darauf schließen, dass in dem Enzym auch nach Inaktivierung durch Denaturierung mithilfe von Chaotrop immer noch gefaltete Kerndomänen existieren.

Um diesen Aspekt weiter zu untersuchen wurde eine weitere Probe der TMPK durch Hitze denaturiert. Dazu wurde das Enzym 30 min lang auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde erneut

3. Ergebnisse

ein CD-Spektrum aufgenommen. Ein Vergleich der Denaturierung durch Chaotrop und durch Hitzeeinwirkung ist in Abb. 3.44 (rechts) gezeigt.

Auch im Fall der Denaturierung durch Hitze ist immer noch kein Signal für ein völlig unstrukturiertes Protein zu sehen, aber der Struktur-Charakter hat im Vergleich zur Chaotrop-Denaturierung weiterhin deutlich abgenommen.

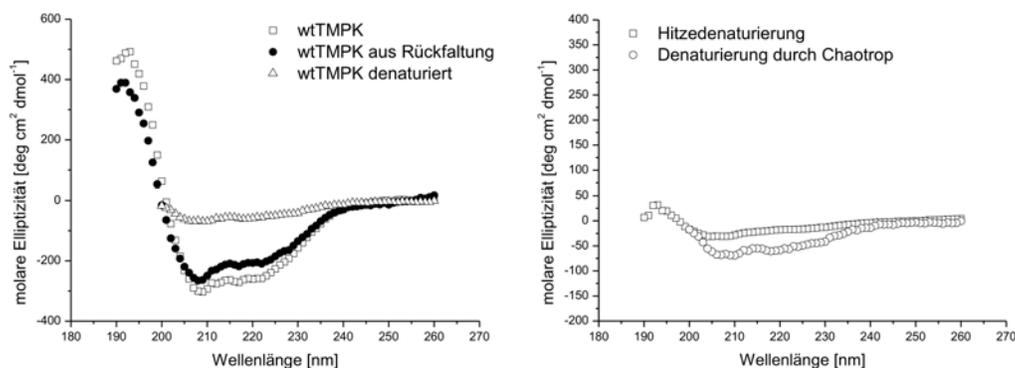


Abb. 3.44: CD-Spektren der wtTMPK vor und nach Denaturierung durch Chaotrop und nach erfolgter Rückfaltung (links). Vergleich der CD-Spektren der Denaturierung der TMPK durch Chaotrop und durch Hitzeeinwirkung (rechts).

3.17 Rückfaltung der semisynthetischen TMPK1-212

Zur Rückfaltung der semisynthetisch hergestellten TMPK1-212 wurden verschiedene Ansätze getestet. Dabei wurde die Kinase bei einer Konzentration von 1 mg/ml in 6 M Gdn·HCl, 50 mM Tris pH 8,0 gelöst und 6 h inkubiert. Anschließend wurde sie gegen den Rückfaltungspuffer (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 100 μM ATP, 100 μM TMP, 50 mM Tris pH 7,5) im Verhältnis 1:1000 dialysiert. Zuerst wurden 4 Ansätze getestet. Dabei wurden als Additive 0,5 mM TCEP, 500 mM Arginin, 40 mM Gluthamin und 5 mM DTT verwendet.

Neben den Ansätzen durch Dialyse wurde noch ein Ansatz durch Schlagverdünnung und ein Ansatz durch langsame Verdünnung durch den Rückfaltungspuffer mit 5 mM DTT untersucht.

Es ergab sich lediglich bei dem Additiv 5 mM DTT und nur durch Dialyse ein Aktivitätsanteil für die semisynthetische TMPK. Der Aktivitätsassay ist in der Abb. 3.45 gezeigt. Zum Vergleich und als Kontrolle wurde außerdem die Aktivität der wtTMPK gemessen. Dabei ist zu bemerken, dass die wtTMPK nur noch eine Steigung von 0,0013 und damit eine k_{cat} von

3. Ergebnisse

0,71 s⁻¹ hatte. Entweder lag ein Verdünnungsproblem vor oder das Enzym ist „gealtert“ und hatte an Aktivität verloren.

Die Steigung der renaturierten semisynthetischen TMPK betrug 0,00021 und die resultierende k_{cat} 0,11 s⁻¹. Damit konnten 16 % Aktivität verglichen mit der gemessenen wtTMPK erhalten werden.

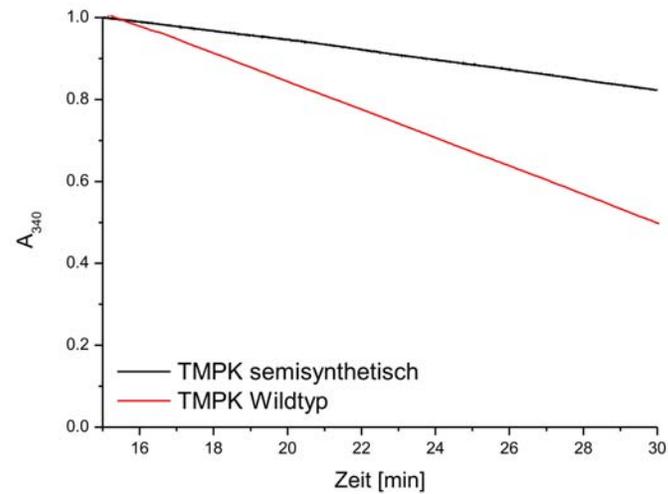


Abb. 3.45: Aktivitätsassay der semisynthetischen TMPK1-212 im Vergleich zur wtTMPK.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden durch kovalente Verknüpfung von Proteinen mit Einzelstrang-Oligonukleotiden mittels nativer chemischer Ligation Protein-DNA-Konjugate hergestellt. Dafür wurde die Familie der Ypt-Proteine aus *S. cerevisiae* verwendet. Ihre mammalischen Gegenstücke, die Rab-Proteine, sind an allen Schritten des vesikulären Stofftransportes in mammalischen Zellen beteiligt und spielen auch bei schweren Krankheiten wie Choroideremia oder dem Hermansky-Pudlak-Syndrom eine Rolle.

Die erhaltenen Protein-DNA-Konjugate wurden dazu verwendet die Proteine hochspezifisch und nicht kovalent mittels DDI auf einem festen Trägermaterial zu immobilisieren. Es wurde gezeigt, dass die native Konformation der Proteine erhalten blieb und dass sie ihr natürliches Substrat GTP binden können. Dadurch sind die Werkzeuge geschaffen, um in einem parallelen Ansatz Bindungspartner aus Hefe-Zelllysaten mittels MALDI-MS zu detektieren und zu identifizieren. Durch die Identifizierung von Wechselwirkungspartnern soll das Verständnis der komplizierten Transportnetzwerke in der Zelle verbessert werden. Dazu wurden die Proteine in *E. coli* als Fusionsproteine mit einem C-terminalen Mxe-Intein und einer Chitin-Bindungs-Domäne überexprimiert und mit einem Cystein-modifizierten Oligonukleotid verknüpft.

4.1 Synthese, Charakterisierung und Reinigung der Protein-DNA-Konjugate

Zur Herstellung der zehn verschiedenen Protein-DNA-Konjugate wurde die native chemische Ligation gewählt. Ursprünglich 1953 von Wieland *et al.* beschrieben, wurde die Bildung eines Amids durch einen nukleophilen Angriff eines Amins auf einen α -Thioester von Dawson *et al.* 1994 zur Kopplung von Peptidsegmenten verwendet. Dadurch war die Möglichkeit gegeben die Größenlimitierung der von Merrifield entwickelten Festphasenpeptidchemie teilweise zu umgehen, bei der Peptide ab einer Länge von 60 AS synthetisch nur sehr aufwendig zugänglich sind und nur sehr geringe Ausbeuten zeigen (Merrifield 1963; Sakakibara 1999). Nun konnten durch Ligation von einzelnen ungeschützten Peptidsegmenten theoretisch Proteine beliebiger Größe hergestellt werden. Allerdings sind auch dieser Methode in der Praxis Beschränkungen auferlegt. So ist eine Kopplung von mehr als vier Segmenten aufgrund der Reinigungsverluste nicht mehr sinnvoll. Ein Beispiel für eine erfolgreiche Totalsynthese eines C-terminal verkürzten H-Ras durch SPPS und Kopplung

über die NCL wurde von Becker *et al.* geliefert (2003). Andere Beispiele für die Ligation von mehreren Segmenten sind eine Proteinmimik der extrazellulären Domäne von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (Pritz *et al.* 2008) oder die konvergente Synthese von humanen Lysozym durch eine kinetisch kontrollierte Ligation (Durek *et al.* 2007).

Für eine erfolgreiche Kopplung mittels NCL sind allerdings zwei funktionelle Gruppen erforderlich. So muss das N-terminale Segment einen C-terminalen α -Thioester besitzen und das C-terminale Segment ein N-terminales Cystein.

Um an den in *E. coli* exprimierten Ypt-Proteinen einen C-terminalen α -Thioester zu generieren, wurde die Intein-Technologie verwendet (Muir *et al.* 1998). Dieser Technologie liegt das Protein-Spleißen zugrunde. Dabei schneidet sich ein Intein aus einer Polypeptidkette selbst heraus und verknüpft das N-Extein und das C-Extein durch eine native Peptidbindung (Muir 2003). Wenn man das C-Extein gegen einen Affinitätstag, wie zum Beispiel die *chitin binding domain* (CBD), austauscht und das C-terminale Asparagin im Intein zu einem Alanin mutiert kann der zweite Schritt, die Umesterung, nicht erfolgen. Das N-Extein bleibt als Thioester am Intein gebunden und kann nun durch die Zugabe von kleinen Molekülen mit einer Sulfhydrylgruppe durch eine Umesterung freigesetzt werden. Dazu wurde in diesem Fall das Natriumsalz der Mercaptoethansulfonsäure (Mesna) verwendet. Durch diese Technologie konnten die exprimierten Ypt-Proteine über Chitinbeads durch Affinitätschromatographie gereinigt werden und gleichzeitig der für die nachfolgende NCL nötige Thioester generiert werden. Dabei fiel auf, dass die Gesamtausbeuten aus Expression und Aufreinigung der verschiedenen Ypt-Proteine stark voneinander abwichen. Sie verliefen von 0,9 mg/L Kultur für das Ypt6-SR bis hin zu 23,5 mg/L Kultur für das Ypt31-SR. Da sowohl die Expression, als auch die Reinigung und das Spleißen der Ypt-Proteine jeweils nach dem selben Protokoll durchgeführt wurde, liegt es nahe, dass die räumliche Struktur oder die C-terminale Aminosäure der Grund für die stark unterschiedlichen Ausbeuten war. Daraus resultiert, dass die Expressionsbedingungen für jedes Ypt-Protein einzeln optimiert werden müssen.

Das C-terminale Segment, in diesem Fall das Oligonukleotid, benötigte zu einer erfolgreichen Ligation ein „N-terminales“ Cystein. Dazu wurde ein 5'-Amino-funktionalisiertes Oligonukleotid verwendet. An dieses wurde in Lösung, vermittelt durch einen N-Hydroxysuccinimid-Aktivester (NHS), das Cystein gekoppelt (Lovrinovic und Niemeyer 2005). Die freien primären Aminogruppen der Nukleobasen führen dabei nicht zu Nebenprodukten. Die Ausbeuten waren dabei für alle Oligonukleotide unabhängig von der Länge (19mer–26mer) oder der Sequenz mit ca. 80 % sehr gut. Durch eine Verschiebung der Retentionszeit nach erfolgter Cysteinkopplung, hervorgerufen durch die *t*-Butyl-Mercapto-

Schutzgruppe der Cystein-Seitenkette, konnten die modifizierten Oligonukleotide durch RP-HPLC hochrein erhalten werden. Dieser Effekt wird ebenfalls in der DNA-Synthese ausgenutzt, wo die letzte 5'-DMT-Schutzgruppe erst nach Reinigung der DNA mittels HPLC abgespalten wird (Will *et al.* 1995). Lovrinovic und Niemeyer (2005) gelang es auf diesem Wege Ausbeuten von bis zu 90 % zu erhalten. Dabei wurde in dieser Arbeit das beschriebene Aufarbeitungs- und Reinigungsprotokoll weiterentwickelt. Anstatt die Fmoc-Gruppe des Cysteins 6 h lang mit wässrigem Ammoniak abzuspalten, wurde in diesem Fall das *Ultrafast cleavage and deprotection reagent* von Beckman verwendet. Dadurch konnte die Reaktionszeit auf 30 Minuten reduziert werden. Die Abspaltungseffizienz war dabei quantitativ (Reddy *et al.* 1994).

Eine Kopplung des Cysteins an der festen Phase führte nur zu geringen Ausbeuten von ca. 30 % und erheblichen Schwierigkeiten in der Reinigung des Cystein-modifizierten Oligonukleotids. Vermutlich war der Anteil an Abbruchsequenzen aus der DNA-Synthese, welche aufgrund des *Capping* über keine 5'-Amino-Modifikation verfügten, so hoch, dass die Verschiebung der Retentionszeit des Cystein-modifizierten Oligonukleotids nicht ausreichend war. Durch eine Überlappung der beiden Peaks war das modifizierte Oligonukleotid stark mit unmodifizierten Oligonukleotid und den Abbruchsequenzen verunreinigt.

Eine Alternative zur Kopplung des Cysteins in Lösung an das 5'-Amino-funktionalisierte Oligonukleotid ist die Kopplung eines 5'-modifizierten Phosphoramidids im Anschluss an die DNA-Synthese (Becker *et al.* 2005). In diesem Fall muss allerdings das sehr hydrolyseempfindliche und, relativ zum Cystein, teure Phosphoramidit vor der DNA-Synthese mit einem Cystein gekoppelt werden. Außerdem wird dieser Baustein während der DNA-Synthese im Überschuss eingesetzt, wobei alle Abbruchprodukte aufgrund des *capping* nicht mehr reagieren können. Dieser Ansatz ist weniger effektiv und in der praktischen Durchführung anspruchsvoller.

Um die Ypt-Proteine und die Cystein-modifizierten Oligonukleotide über die native chemische Ligation miteinander zu verknüpfen, wird ein Thiol als Ligationsvermittler hinzugegeben. Zur Protein-DNA-Kopplung wurde Ethanthiol hinzugefügt. Dadurch wurde der weniger aktive Mesna-Thioester, welcher nach dem Spleißvorgang gebildet wurde, durch Umesterung in einen reaktiveren Alkylthioester umgewandelt.

Unter optimalen Bedingungen konnten Ligationsausbeuten zwischen den Ypt-Proteinen und den Cystein-modifizierten Oligonukleotiden von bis zu 60 % erreicht werden. Die Verwendung anderer Thiole (Tabelle 3.4) führt zu keiner Steigerung der Ausbeuten, obwohl zum Beispiel Aryl-Thioester, wie Mercaptophenyllessigsäure (MPAA) oder Thiophenol

reaktiver sind, als Alkyl-Thioester, da sie bessere Abgangsgruppen sind (Dawson *et al.* 1997). Allerdings war bei einer Ligation mit MPAA kein Reaktionsprodukt zu detektieren. Vermutlich führten kurzfristige Änderungen des pH-Wertes zu einer verminderten Löslichkeit des MPAA's, was zur Präzipitation führte. Dadurch stand das MPAA zur Vermittlung der Ligation nicht mehr zur Verfügung. Thiophenol als Reagenz war nicht sinnvoll, da es während der Ligation Disulfide bildet, welche präzipitieren. Das könnte denaturierend auf die eingesetzten Proteine wirken. Die entstandenen Disulfide können durch eine Aufarbeitung mit β -Mercaptoethanol zwar wieder gelöst werden, aber es ist nicht klar, ob dadurch Disulfide der Protein-Tertiärstruktur beeinflusst werden. Das Ethanthiol hingegen wird durch die zur Reinigung verwendeten Größenausschlusschromatographie schnell und vollständig entfernt. Eine Ligation in chaotrop-haltigen Medium wurde nicht durchgeführt. Der Vorteil einer verbesserten Zugänglichkeit des Thioesters wäre, durch eine notwendige Rückfaltung der Proteine, wieder verloren gegangen.

Im Fall der Ypt-Proteine sollte die Zugänglichkeit des α -Thioesters jedoch ausreichend sein. Die C-Termini der Ypt-Proteine sind unstrukturiert und flexibel. In lipidierter Form ermöglichen sie eine Membranassoziation an Vesikel oder Zellkompartimente (Pylypenko *et al.* 2006). Die Möglichkeit einer partiellen Faltung des C-Terminus oder die Verminderung der Zugänglichkeit durch die Bindung des C-Terminus in Protein-Taschen könnte durch Zugabe geringer Mengen an Chaotrop während der Ligation verhindert werden. Allerdings kann als Konsequenz auch die übrige Proteinstruktur beeinflusst werden.

Die Löslichkeit der Ypt-Proteine ist mit mehr als 10 mg/ml ($\sim 400 \mu\text{M}$) hoch genug für die NCL. Daher muss sie nicht durch eine Zugabe von Chaotropen oder Detergenzien erhöht werden. Auch die Löslichkeit des Reaktionspartners, der DNA, in Wasser ist sehr hoch. DNA bildet in Wasser bei basischen pH-Werten eine starke Hydrathülle. Diese könnte sich als störend für die Zugänglichkeit des 5'-Cysteins erweisen und damit ein Grund sein für die Ligationsausbeuten von 60 %. Ein weiterer Grund könnte eine elektrostatische Abstoßung der DNA von negativ geladenen Regionen auf der Proteinoberfläche sein. Um diese Möglichkeit auszuschließen könnte ein längerer Linker, als der C_6 -Linker zwischen dem Oligonukleotid und dem Cystein verwendet werden. Es gibt Beispiele aus der Literatur, wo längere Linker, wie zum Beispiel ein Hexaethylglykol- oder ein Isonikotinsäurelinker verwendet wurden. Der von Lovrinovic *et al.* (2005) verwendete Hexaethylglykollinker senkte die Ligationsausbeuten zwischen EYfp-SR und dem Oligonukleotid sogar von 60 % auf 30 %. Der Isonikotinlinker den Takeda *et al.* (2004) verwendet haben, führte zu einer Ligationsausbeute zwischen ECfp-SR und einem Oligonukleotid von 80 %. Daher hat eine

Verlängerung des schon vorhandenen C₆-Aminolinkers keinen systematischen Einfluss auf die Reaktionsausbeuten.

Die Zugänglichkeit des Cysteins könnte auch durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen des Oligonukleotids vermindert worden sein. Diese wären dann sequenzspezifisch und könnten durch eine Änderung der DNA-Sequenz verhindert werden. Allerdings ist es eine anspruchsvolle Aufgabe Sequenzbibliotheken für die DDI zu erstellen. Dabei sollten die sich zwischen den verschiedenen Sequenzen wiederholenden Teilstücke so kurz, wie möglich sein. Außerdem sollten die Oligonukleotide alle annähernd gleich lang sein und die Schmelztemperaturen sollten maximal zwei Grad voneinander abweichen. Es sollten keine längeren GC-haltigen Bereiche nebeneinander liegen, an den Enden des Oligonukleotids sollte aber zur stabileren Hybridisierung ein GC-Paar vorkommen (Feldkamp *et al.* 2003). Wegen dieser hohen Anforderungen an eine Sequenzbibliothek, ist es sinnvoller auf einige Prozent an Ausbeute zu verzichten, als eine neue Sequenzbibliothek zu erstellen. Die verwendeten DNA-Bibliotheken waren speziell entwickelt für eine Immobilisierung auf DNA-Mikroarrays über die DDI (Wacker und Niemeyer 2004; Feldkamp *et al.* 2004).

Ein wichtiger Aspekt bei den Reaktionsbedingungen der NCL ist der pH-Wert. Meist wird die NCL bei pH-Werten von 7,2 bis 7,5 durchgeführt. Stark erhöhte pH-Werte führen zu einigen negativen Nebeneffekten, wie der Hydrolyse des Thioesters. Außerdem wird bei sehr hohen pH-Werten die Nukleophilie von Lysin-Seitenketten so stark erhöht, dass sie mit dem Thioester reagieren können und es zu unerwünschten Nebenprodukten kommt. Saure Reaktionsbedingungen senken die Nukleophilie des Cysteins herab, so dass es zu keiner Ligation kommt (Haase und Seitz 2008). Im Fall der Ligation zwischen Proteinen und DNA hat sich herausgestellt, dass für effektive Ligationen pH-Werte von 8,0 - 8,5 benötigt werden. Dies wird auch durch die Literatur bestätigt (Takeda *et al.* 2004; Lovrinovic *et al.* 2005).

Es gibt noch zahlreiche Alternativen zur NCL, um ein Protein mit einem Oligonukleotid zu verknüpfen. So gibt es zum Beispiel die Möglichkeit Maleinimid-funktionalisierte Oligonukleotide über Cystein-Seitenketten an das Protein zu binden (Kukolka und Niemeyer 2004), oder Succinimid-funktionalisierte Oligonukleotide über Lysin-Seitenketten (Glynow *et al.* 2003). Damit allerdings die Regioselektivität und Stöchiometrie genau kontrolliert werden können, braucht es eine ortsspezifische Kopplung des Oligonukleotids. Durch eine bioorthogonale Reaktion, wie der NCL, bei der die ungeschützten Proteinseitenketten, die integralen Cysteine eingeschlossen, die Reaktion nicht stören, werden all diese Bedingungen erfüllt.

Es gibt mittlerweile zahlreiche bioorthogonale ortsspezifische Reaktionen, wie z. B. die Staudingerligation oder die „Click“-Chemie (Grandjean *et al.* 2005, Kalia *et al.* 2007). Sie alle haben gemein, dass sie bei physiologischen Bedingungen in wässrigen Puffern funktionieren, aber auch, dass die reaktive Gruppe in das entsprechende Protein eingeführt werden muss. Daher bieten diese beiden Reaktionstypen keinerlei Vorteile gegenüber der NCL.

Zum Nachweis der gebildeten Protein-DNA-Konjugate haben Lovrinovic und Niemeyer (2005) ein natives Polyacrylamidgel-Gel mit *SybrGold*-Färbung verwendet. Allerdings ist dies, genau wie die Coomassie-Färbung in einem SDS-Gel, kein eindeutiger Beweis für eine erfolgreiche Bildung eines Konjugates.

Dies könnte nur eine Charakterisierung mittels Massen-Spektrometrie erbringen. Allerdings sind die Ionisierungseigenschaften von DNA und Proteinen aufgrund ihrer Ladungen sehr unterschiedlich. Es werden verschiedene Matrices und unterschiedliche Geräteparameter verwendet. Schon MALDI-MS mit DNA alleine ist nicht trivial, auch wenn seit den ersten Publikationen z. B. von Wu *et al.* (1993) weit genauere Spektrometer vorhanden sind. Einige Arbeitsgruppen, wie zum Beispiel das Labor von Teruyuki Nagamune (Takeda *et al.* 2004) veröffentlichen Massen ihrer Protein-DNA-Konjugate, zeigen aber keine Spektren anhand deren man die Qualität und Genauigkeit ihrer Messung bewerten könnte. Allerdings gibt es einige publizierte Beispiele von Massen-Spektrometrie von Peptid-DNA-Konjugaten (Olejnik *et al.* 1999), Proteinen mit einigen gekoppelten Nukleotiden (Humenik *et al.* 2007) oder von Oligonukleotiden mit gekoppelten Fluoreszenz-markierten Aminosäuren (Halpin *et al.* 2004). In allen Beispielen überwiegt physikalisch entweder das Protein oder die DNA. Somit muss der Analyt nicht wie ein Hybridmolekül behandelt werden, was eine Charakterisierung über Massenspektrometrie möglich macht.

Da dies bei einem Protein-DNA-Konjugat nicht der Fall ist, wurde zum Nachweis ihrer Bildung ein abgewandelter *Southernblot* entwickelt. Der *Southernblot* wurde ursprünglich von E. M. Southern (1975) eingeführt um DNA-Sequenzen nach Hybridisierung mit DNA-Sonden spezifisch nachzuweisen, welche meist isopenmarkiert waren. Da es sich in diesem Fall um ein Protein-DNA-Konjugat handelte sollten die Eigenschaften des *Southernblots* mit denen eines *Westernblots* vereinigt werden (Towbin *et al.* 1979). Nach der SDS-PAGE und der Übertragung auf eine Nitrocellulose-Membran wurden Biotin-markierte komplementäre Oligonukleotide verwendet um als Sonden zu fungieren. Ein Fusionsprotein aus der

alkalischen Phosphatase und Streptavidin konnte spezifisch binden und durch die Dephosphorylierung des NBT-BCIP-Paars die Konjugat-Bande sichtbar machen.

Dieser Nachweis ist hochspezifisch. Proteine werden nicht angefärbt und es gibt keine sichtbare Hintergrund-Färbung der Nitrocellulosemembran. Wenn nur Oligonukleotid auf das SDS-Gel aufgetragen wird, ist eine leichte violett-Färbung über die gesamte Bahn zu sehen. Außerdem bei Überbelichtung einige schwächere Banden, welche vermutlich auf Oligomere der nicht umgesetzten Cystein-modifizierten Oligonukleotide zurückzuführen sind. In einem parallel durchgeführten SDS-Gel mit Coomassie-Färbung, ist eine deutliche Bande gleichen Molekulargewichts zu sehen. Daher ist anzunehmen, dass die eindeutige Bande dem Protein-DNA-Konjugat entspricht und nicht unligierter DNA. Die Nachweisgrenze beträgt etwa 200 ng Material. Da der *blot* sehr spezifisch ist und auch bei kleinen Probenmengen klare Ergebnisse liefert, ist er zum Nachweis der Bildung von Protein-DNA-Konjugaten geeignet. Leary *et al.* (1983) haben ein ähnliches Experiment durchgeführt. In einem *dotblot* Experiment konnten sie über biotinylierte Sonden und einem Konjugat aus Avidin und einem hochaktiven alkalischen Phosphatase-Polymer mit dem NBT-BCIP-Reagenz DNA-Proben von bis zu 1-2 pg Material nachweisen.

Da die Reaktionsausbeuten zwischen den Ypt-Proteinen und den Oligonukleotiden nur 60 % betragen, verblieben selbst bei einem äquimolaren Verhältnis von DNA zu Protein 40 % nicht umgesetztes Oligonukleotid in der Reaktionslösung. Dieses muss entfernt werden, da es sonst in Mikroarray-Experimenten mit den Konjugaten um die Bindungsplätze konkurriert und damit die Signalstärke und die Nachweisgrenze herabsetzt.

Dies kann über Ionenaustausch-Chromatographie geschehen. Allerdings hat diese Methode einige Nachteile. Da die Oligonukleotide unter schwach basischen Bedingungen aufgrund des Phosphatrückgrates, stark negativ geladen sind, unterscheidet sich der isoelektrische Punkt (pI) der Oligonukleotide nur wenig von dem der gebildeten Konjugate. Daher gibt es selbst bei einem schwachen Anionenaustauschermaterial, wie Diethylaminoethyl-Cellulose (DEAE), nur bei optimalen Flussraten und kleinen Probenvolumina keine Überlappung der Elutionsfraktionen von Konjugat und nicht umgesetzten Oligonukleotid. Außerdem binden die Konjugate so stark an das Säulenmaterial, dass sie erst ab Natriumchlorid-Konzentrationen von 800 mM oder höher von der Säule eluieren. Neben einem Verdünnungseffekt werden die Proteine durch die hohe Ionenstärke einer möglichen Denaturierung ausgesetzt und im Anschluss an die Reinigung muss der Puffer ausgetauscht werden. Eine Möglichkeit dies zu umgehen, wäre ein Herabsenken des pH-Wertes unter den

pI und die Verwendung eines Kationenaustauschers. Dadurch würden die Oligonukleotide, ohne an das Säulenmaterial zu binden, im Durchfluss vorliegen und die Konjugate durch einfache Elution hochrein erhalten werden. Für die Ypt-Proteine ist dies jedoch keine Alternative, da sie in sauren Puffern aggregieren.

Eine andere mögliche Methode ist eine Reinigung durch Größenausschluss-Chromatographie. Mit geeigneter Porengröße und Säulenlänge ist eine Trennung des Oligonukleotids von den vierfach größeren Konjugaten möglich. So konnten hochreine Ypt-DNA-Konjugate erhalten werden. Vorteilhaft ist, dass die Konjugate nur durch einen Verdünnungseffekt beeinträchtigt, direkt in ihrem nativen Puffer eluiert wurden.

Die Oligonukleotide eluierten während der Gelfiltration bei einer Retentionszeit, welche einem globulären Protein der 3–4 fachen Masse entsprach. Ein möglicher Grund dafür kann die räumliche Struktur der Oligonukleotide sein. Doppelstrang-DNA von 20 bp hat genau zwei ganze Windungen, ist als ca. 7 nm lang. Ein Einzelstrang-Oligonukleotid von 19-26 bp könnte, wenn es nicht als Zufallsknäuel vorliegt, sondern gestreckt, ähnlich lang oder sogar länger sein. Da durchschnittliche globuläre Proteine einen Durchmesser von 4-9 nm haben, liegt der Verdacht nahe, dass ein Oligonukleotid sich in der Gelfiltration ähnlich verhält. Eine zweite Erklärung kann eine Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial sein. Die Matrix der Gelfiltrationssäule basiert auf Silikaten. Diese Matrices werden in der Praxis auch verwendet um DNA zu reinigen (Cady *et al.* 2003). Bei hoher Ionenstärke und niedrigem pH-Wert bindet DNA an das Säulenmaterial. Proteine können ausgewaschen werden und die DNA durch einen Puffer geringer Ionenstärke wieder eluiert werden. Die NaCl-Konzentration hatte mit 500 mM noch keine Hochsalzbedingungen und der pH-Wert betrug nur 7,5 statt der nötigen 2-3, aber die DNA verblieb auch nicht vollständig auf der Säule sondern eluierte nur langsamer.

Ozyhar und Kiltz (1991) fanden ein ähnlich erhöhtes Molekulargewicht des Komplexes aus PonA-EcdR und einem hsp27-ds-Oligonukleotid in der Gelfiltration. Aber ihre Interpretation ging dahin, dass das Protein Dimere bildet.

4.2 Immobilisierung der Protein-DNA-Konjugate

Zur Immobilisierung der Ypt-Proteine auf den festen Trägern wurde die *DNA-directed-Immobilization* (DDI) gewählt. Eingeführt in den 90er Jahren, ist sie eine milde Methode zur Protein-Immobilisierung (Niemeyer *et al.* 1994). Sie folgt dem hochspezifischen aber nicht kovalenten Ansatz zur Protein-Immobilisierung. Dabei hybridisiert das Oligonukleotid,

welches kovalent mit dem Protein verknüpft ist, an ein komplementäres Oligonukleotid, welches kovalent an die Oberfläche gebunden ist. Die Immobilisierung ist dadurch adressierbar und hochspezifisch und die Proteine liegen durch die ortsspezifische Verknüpfung mit der DNA in einer gleichförmigen Orientierung auf dem Mikroarray vor. Außerdem bildet die DNA gleichzeitig einen zusätzlichen Spacer, der den Abstand zur Oberfläche weiter vergrößert. Dadurch wird eine Anlagerung von Proteinen vereinfacht. Außerdem wird durch die starre Struktur der DNA die Beladungsdichte erhöht, da die DNA nicht, wie zum Beispiel Polyethylenglykolketten, Schleifen bildet und damit die funktionelle Gruppe von der flüssigen Phase wegzeigt.

Durch diese Methode werden die langjährigen Erfahrungen und Vorteile der DNA-Chiptechnologie, wie Miniaturisierung, Automatisierung und Wiederverwendbarkeit der Chips, für die Bildung eines Protein-Mikroarrays genutzt.

Es gibt zahlreiche mögliche Oberflächen, wie z. B. Gold oder Polymere. Am häufigsten wird allerdings Glas verwendet, weil es eine Reihe von Vorteilen bietet. Es ist nicht porös, leicht erhältlich, transparent und hat eine schwache intrinsische Fluoreszenz. Außerdem ist die Oberfläche durch einfache Chemie zu modifizieren. Nach einer Aktivierung und Funktionalisierung der Oberfläche wird häufig ein Dendrimer gekoppelt, um die funktionale Oberfläche noch weiter zu erhöhen (Benters *et al.* 2001).

Für erste Fluoreszenz-basierte Experimente wurden einfache Glasträger verwendet. In späteren MALDI-Chip-Experimenten wurden Silizium-Wafer verwendet. Diese haben eine ähnliche Oberflächenchemie, leiten aber den Strom. Dies macht sie für eine Detektion von Bindungspartnern mittels MALDI-MS geeignet, da die gebildeten Ionen im elektrischen Feld zur Trennung beschleunigt werden. Ein Isolator, wie Glas, im elektrischen Feld wirkt dabei störend.

Zuerst wurden die Bedingungen zur Immobilisierung der Protein-DNA-Konjugate auf dem DNA-Chip optimiert. Dazu musste eine Möglichkeit gefunden werden, das immobilisierte Konjugat sichtbar zu machen. Da keine Antikörper gegen die Ypt-Proteine vorlagen, wurde ein Fusionskonstrukt aus der GFP-Mutante Cherry und dem Ypt7 verwendet. Das Konjugat konnte mit einem Signal zu Rausch-Verhältnis von ca. 3:1 spezifisch an der Sequenz D detektiert werden. Die niedrige Signalstärke kann durch abweichende Wellenlängen der Laser und Filter im verwendeten Scanner von den Excitations- und Emissionsmaxima des Cherry erklärt werden. Alternativ könnte eine andere GFP-Mutante verwendet werden, oder aber das entsprechende Ypt-Protein, vor oder nach der Ligation mit dem Oligonukleotid, mit Cy5 markiert werden.

Um aus Hefe-Zelllysaten *Downstream*-Effektoren zu detektieren, mussten die immobilisierten Ypt-Proteine zuerst durch einen GDP-GTP-Austausch in ihre aktive Form überführt werden. Der Austausch hätte schon vor der Ligation der GTPase mit dem Oligonukleotid durchgeführt werden können. Dazu hätte man eine nicht hydrolysierbare GTP-Variante, das GppNHp, verwenden können. Es sollte jedoch das Protein auf der Oberfläche detektierbar sein und gleichzeitig ein erfolgreicher Austausch visualisiert werden. Dazu wäre ein Fluoreszenz-markiertes GppNHp der passenden Wellenlängen erforderlich. Da dieses nicht erhältlich war, musste eine Fluoreszenz-markierte GTP-Variante (GTP-ATTO-633) verwendet werden. Diese aber ist sehr teuer, was einen Austausch vor der Ligation unökonomisch macht. Außerdem besteht die Möglichkeit einer langsamen Hydrolyse des GTP durch die GTPasen, was die Konjugate wieder in ihre inaktive Form überführt hätte. Daher wurde der Austausch an dem immobilisierten Konjugat auf der festen Oberfläche, analog zum Austausch in Lösung, durchgeführt (John *et al.* 1990). Dadurch wurde gezeigt, dass die Konjugate nach der Ligation und Immobilisierung in ihre aktive Konformation überführt werden können.

Um die native Faltung der immobilisierten Konjugate und deren Bindungseigenschaften weiter zu untersuchen, wurde der GEF DSS4 an das Ypt1 in einem Mikroarray-Experiment gebunden. DSS4 ist ein GEF, welcher in nukleotidfreier Umgebung mit einer hohen Affinität ($K_D = 1 \text{ nM}$) an Ypt1 bindet und dabei den Austausch zwischen GDP und GTP katalysiert. In Anwesenheit von Nukleotid steigt der K_D -Wert auf $20 \mu\text{M}$ für das Ypt1 (Itzen *et al.* 2007). Es konnte gezeigt werden, dass das DSS4 in Abwesenheit von Nukleotiden an das Ypt1 gebunden hat und dabei ein Nukleotid aus der Bindungstasche der GTPase verdrängen konnte. Aber in diesen Experimenten waren die S/N-Verhältnisse mit 1,2 bis 1,8 sehr klein. Bei dem Cy5-markierten DSS4 kam es, vermutlich wegen der gesteigerten Hydrophobizität, zur unspezifischen Bindung auf dem Chip, was die Hintergrund-Fluoreszenz erheblich ansteigen ließ. In einem ähnlichen Beispiel ließen Becker *et al.* (2001) aktives H-Ras an die über einen His-Tag auf eine Ni^{2+} -funktionalisierte Oberfläche immobilisierte *Ras binding domain* (RBD) binden. Detektiert wurde die Fluoreszenz von NBD, welches nahe der Bindungsfläche zwischen dem Ras und der RBD kovalent gebunden war. Dabei wurde in etwa ein S/N-Verhältnis von 5–6 erreicht.

Eine mögliche Erklärung für die teilweise geringen S/N-Verhältnisse ist der Waschvorgang. Um Arrays zu sparen (es befanden sich jeweils drei komplette Arrays auf einem Glaträger) wurden alle Waschgänge im *flow wash* mit einer Pipette durchgeführt (ca. 15 ml pro Array). Andere schwenken den gesamten Glaträger in einer Kammer mit Waschpuffer (persönliche

Mitteilungen Dr. Hendrik Schroeder). Dadurch kann die Effizienz des Waschens unzureichend sein, was die Hintergrundfluoreszenz ansteigen lässt.

In vergleichenden Experimenten mit kovalenten Immobilisierungsstrategien, wie der Click-Sulfonamid-Reaktion (Govindaraju *et al.* 2008; Kolb *et al.* 2001) oder einer einfach NHS-Ester funktionalisierten Oberfläche (Patel *et al.* 1997), wurden die Arrays jedoch gleich behandelt. In diesen Experimenten waren die S/N-Verhältnisse weit besser gegenüber dem Ansatz der DDI. Für die direkte Fluoreszenzauslesung nach Immobilisierung des Cherry-Ypt7-Konjugates wurde für die Click-Sulfonamid-Reaktion ein S/N-Verhältnis von 26 und für die NHS-funktionalisierten Oberflächen ein S/N-Verhältnis von 7 erhalten. Dem gegenüber steht der Ansatz der DDI, welcher lediglich zu einem S/N-Verhältnis von 3 führte. Für den GDP-GTP-Austausch wurden mit einem S/N-Verhältnis von 8 für die DDI und einem S/N-Verhältnis von 10 für die NHS-funktionalisierten Oberflächen ähnliche Ergebnisse erhalten.

Daher ist es wahrscheinlicher, dass durch die schrittweise Steigerung von der Hybridisierung eines Konjugates, über den GDP-GTP-Austausch bis hin zur Bindung des DSS4 durch unvollständige Bindung die Signalstärker immer weiter nachlässt.

Allerdings war die Reproduzierbarkeit der Experimente nicht gut. Die Signalstärke und das S/N-Verhältnis wichen von Versuch zu Versuch stark von einander ab. In der Abbildung 4.1 sind drei Beispiele für den GDP-GTP-Austausch am Konjugat Ypt1-F2 gezeigt. Dabei bindet das Konjugat zwei mal an die Sequenz F6 und einmal an die Sequenz F2. In einem Mikroarray-Experiment gab es für jede Sequenz 16 *Spots*, also jeweils 16 positive Signale. Dabei wiesen die einzelnen *Spots* untereinander starke Abweichungen auf. So gab es unterschiede in der Fluoreszenzintensität bis zu einem Faktor von vier. Aber laut Literatur sind für die einzelnen *Spots* je nach DNA-Bibliothek Abweichungen von 25–75 % durchaus normal (Feldkamp *et al.* 2004).

Neben dem schwachen Signal zu Rausch-Verhältnissen ergab sich ein weiterer Nachteil der DDI. Es kam in den Mikroarray-Experimenten zu Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Sequenzen. Die Kriterien für eine DNA-Bibliothek sind in Abschnitt 4.1 skizziert. Die verwendeten Sequenzen wurden von Feldkamp *et al.* (2004) entwickelt. Sie haben eine Bibliothek von 10 Oligonukleotiden erstellt, in welcher die Oligonukleotide eine Länge von 22 Basenpaaren (bp) haben und das GC Verhältnis 50 % beträgt. Außerdem befinden sich sämtliche Schmelztemperaturen im Bereich 62–64 °C und das längste öfter vorkommende Sequenzmotiv hat eine Länge von vier Basenpaaren. Die größte gemessene Kreuzreaktivität zwischen den Sequenzen betrug 15 % der Intensität des schwächsten gemessenen Signals.

Aus dieser Bibliothek wurden die Sequenzen F2, F3, F4 und F6 für diese Arbeit verwendet. Diese Bibliothek wurde schon in früheren Arbeiten ohne Beanstandung verwendet (Schroeder *et al.* 2007). In der Abbildung 4.1 ist ein Beispiel einer solchen Kreuzreaktivität gezeigt. Dabei kam es nicht nur vor, dass ein Oligonukleotid in schwächerer Form auch an eine nicht komplementäre Sequenz band, sondern in einigen Fällen, wie dem Ypt53-F3, band es fast vollständig an eine nicht komplementäre Sequenz und nur schwach an die voll komplementäre Sequenz.

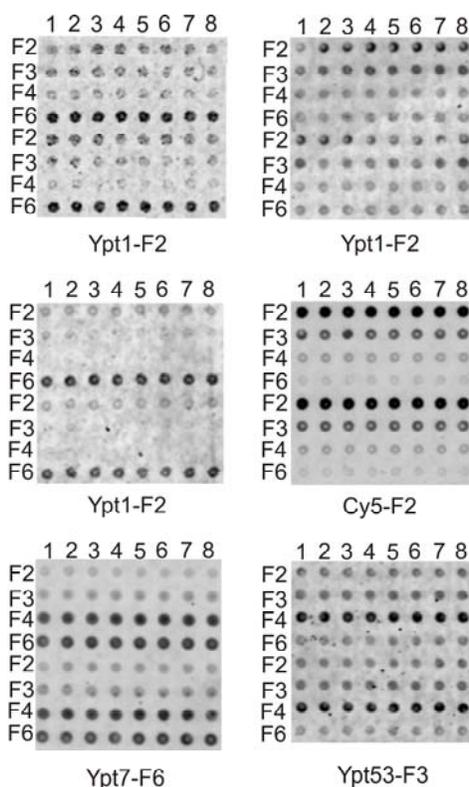


Abb. 4.1: Beispiele von Kreuzreaktivitäten zwischen den einzelnen verwendeten Sequenzen.

In Kontrollexperimenten mit unligiertem Protein oder dem reinen Nukleotid GTP-ATTO wurde keinerlei Fluoreszenzsignal erhalten. Daher ist auszuschließen, dass sie unspezifisch an die immobilisierten Oligonukleotide oder die Oberfläche binden. Auch eine Aggregation auf den *Spots*, hervorgerufen durch die Oberflächenaktivierung, muss ausgeschlossen werden, da sonst alle *Spots* ein Signal zeigen würden und nicht nur eine oder zwei Sequenzen.

Da die Cy5-markierten Oligonukleotide primär an die komplementären Sequenzen binden kann die Sequenz nicht die alleinige Ursache für die unspezifische Bindung sein. Eine mögliche Erklärung wäre eine Änderung der Konformation der Proteine bei Kontakt zur Oberfläche. Diese Faltung könnte DNA-bindende Domänen schaffen. Dadurch könnte das

Protein bestimmte DNA-Sequenzen erkennen und daran binden. Da das Protein alleine, wie erwähnt, zu keinem Signal führt, müsste das kovalent gebundene Oligonukleotid diese Änderung unterstützen. Allerdings spricht dagegen, dass die Ypt-Proteine in ihre aktive Form überführt werden können und ihre natürlichen Bindungspartner binden können. Durch einen einfachen Austausch der verschiedenen Konjugat-Paarungen kann dies überprüft werden.

Die Kreuzreaktivitäten zwischen den verschiedenen Sequenzen behindern parallel durchgeführte Experimente, in denen verschiedene Ypt-Proteine gleichzeitig auf dem Array immobilisiert sind.

Um eine Detektion von Bindungspartnern an die Ypt-Proteine mittels MALDI-MS möglich zu machen, musste zuerst die Probenpräparation optimiert werden. Dabei wurde von der Matrix α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure ausgegangen (Gavin *et al.* 2005). Versuche mit Sinapinsäure als Matrix führten zu keinen Signalen. Da im Fall einer Chip-Messung die Probe nicht vor dem Auftragen mit der Matrix vermengt werden kann, ist die Schichtdicke der Matrix essentiell für die Messung. Ist sie zu dick, kann der Analyt auch bei hohen Laserenergien nicht ionisiert und in die Gasphase überführt werden. Außerdem ist bei diesem Verhältnis von Analyt zu Matrix die „Konzentration“ des Analyten im Mischkristall zu stark verdünnt. Ist die Matrixschicht allerdings zu dünn, ist lokal das Mengenverhältnis von Analyt zu Matrix zu groß. Die Matrix-Moleküle können durch den Laserpuls nicht wirksam in Schwingung gebracht werden um in die Gasphase überzutreten und damit den Analyten mit sich zu reißen.

Das Problem konnte gelöst werden, indem die Matrix in Aceton gelöst wurde. Dadurch verlief die aufgetragene Matrixlösung sehr schnell und bedeckte das gesamte Array, bevor die Zimtsäure kristallisierte.

Als Versuchspaar für erste MALDI-Chip-Experimente wurden das Protein-DNA-Konjugat Ypt1-F2 und sein Bindungspartner DSS4 verwendet. Das Bindungsexperiment fand dabei unter Nukleotid-freien Bedingungen statt. Nach der Optimierung der Matrixschichtdicke und der Geräteparameter, war es möglich an das Ypt1-F2 gebundenes DSS4 zu detektieren.

Ein Problem eher praktischer Natur war, dass die auf den Chip aufgetragenen *Spots* während der MALDI-Messung oft nicht mehr zu sehen waren. Das machte es schwierig die *Spots* mit dem Laser anzuvisieren. Durch die aufgetretene Kreuzreaktivität war es außerdem schwierig die richtige Sequenz zu finden, in der der Bindungspartner zu suchen war.

Mit ortsauflösenden hochpräzisen MALDI-Spektrometern sollte es möglich sein den Laser und den Siliziumträger genau zu justieren, um die einzelnen *Spots* zielgenau anvisieren zu

können. Außerdem sollte eine Automatisierung der Messung möglich sein, welche für ein *Screening* größerer Protein-Familien, wie der Rab-Familie oder großen Protein-Bibliotheken, nötig ist.

Durch die geringe Schichtdicke der Matrix-Substanz reichte die gebundene Proteinmenge auf einem *Spot* oft nur für einen kurzen Laserpuls. Das erschwert die Reproduzierbarkeit und führt oft zu Signalen mit einer niedrigen Intensität. Um einen entdeckten Bindungspartner der Ypt-Proteine durch MS/MS-Methoden sequenzieren zu können, muss das entsprechende Konjugat zur Zeit noch einmal großflächig auf einem Chip aufgetragen und mit Hefe-Zellysat inkubiert werden.

Die Schwierigkeiten der Probenpräparation, der Kreuzreaktivitäten und der Instrumentjustierung bei Verwendung der DDI und Siliziumwafer, sind gegenüber 3 D-Matrices große Nachteile. So haben Rubina *et al.* (2003) eine 3 D-Matrix auf der Basis von photopolymerisiertem Methacrylat hergestellt und untersucht. Die 3 D-Matrices sollen gegenüber den 2 D-Oberflächen den Vorteil einer weit höheren Beladungsdichte haben und damit die Nachweisgrenze erheblich senken (Angenendt *et al.* 2002). Der kritische Punkt bei 3 D-Matrices ist die Porengröße, damit sowohl die Protein-Immobilisierung, als auch die Bindung eines Bindungspartners effizient ablaufen kann. Auf den 2-D-Oberflächen gibt es keine Poren. Die Oberflächen sind den zu immobilisierenden Proteinen direkt zugänglich und durch Dendrimerstrukturen ist die Funktionalisierung stark erhöht.

Beispiele für die Anwendung von 3 D-Matrices sind Untersuchungen zur Interaktion einiger Wechselwirkungspartner. So wurde die Wechselwirkung des monoklonalen anti Mensch Interleukin- α (Il- α) mit dem Immunoglobulin G (IgG) aus der Ziege oder dem Rinder Trypsin und dem SPC 1 Trypsin Inhibitor bei Erhaltung der Protein-Aktivität nachgewiesen. Auch die Detektion von Cytokinen (TNF- α) sind durch Antikörper (MAB 1) aus komplexen Zellysaten heraus bis zu einer Grenze von 20 fM nachgewiesen worden (Gavin *et al.* 2005).

Dem gegenüber steht der Ansatz mittels DDI von Becker *et al.* (2005), welche das Ras-RBD Paar untersucht haben. Ihnen gelang es ebenfalls mit immobilisierter RBD Ras in einer Konzentration von 3 nM nachzuweisen, was um einen Faktor von 50 (Wechselwirkung Ras:GppNHp-RBD K_D : 160 nM in Lösung) unter der Dissoziationskonstante der Wechselwirkung liegt. Der größte Vorteil der DDI, verglichen mit den 3 D-Gelen, ist die Möglichkeit einer parallelen Versuchsdurchführung.

Welche Methode nun sensitiver und in ihrer Anwendung einfacher ist gilt es im direkten Vergleich zu untersuchen. Ein Punkt spricht allerdings für die 3 D-Gele: Die Polymere

werden ausgehend von einer vorgemischten Lösung direkt auf dem Glaträger polymerisiert. Es entstehen gut sichtbare *Spots*, welche ein Anvisieren im MALDI erheblich erleichtern. Eine andere Methode zur Detektion von Bindungspartnern aus Zellysaten heraus wurde 2000 von Kutai *et al.* entwickelt. Sie immobilisierten 2zRanQ69L(GTP) auf IgG-Sepharose und setzten sie einem HeLa-Zell-Extrakt aus. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch den Edman-Abbau sequenziert. Dadurch wurde ein neuer Bindungspartner, das RanBP16, identifiziert. Diese Methode ist verglichen mit den anderen ebenfalls erfolgreich gewesen. Aber sie ist in ihrer Durchführung wesentlich aufwendiger. Da auf dem Säulenmaterial jeweils nur ein Protein immobilisiert werden kann ist es bei dieser Methode nicht möglich mehrere Proteine parallel zu untersuchen.

Abschließend kann gesagt werden, dass die DDI zur Immobilisierung von Proteinen auf festen Trägern eine sehr effektive Methode ist. Die Cystein-modifizierte Oligonukleotide werden in hohen Ausbeuten und hoher Reinheit erhalten. Die Proteine können durch die Intein-Technologie hochrein erhalten werden, bei gleichzeitiger Einführung der zur NCL benötigten funktionellen Gruppe. Die DNA-Sequenzen können mit den eingesetzten Proteinen beliebig kombiniert werden und die Ligation bietet hohe Ausbeuten.

Zur Immobilisierung ganzer Protein-Familien allerdings müssen größere Sequenz-Bibliotheken erstellt werden, welche keine Kreuzreaktivitäten aufweisen. Wenn die instrumentellen Schwierigkeiten der MALDI-Messung behoben sind, ist der Weg bereitet Bindungspartner der aktiven oder inaktiven Ypt-Proteine zu finden und zu sequenzieren. Das kann die Entwicklung von Modellen zum Ablauf der vesikulären Transportvorgänge unterstützen.

4.3 Expression, Peptidfestphasensynthese und Ligation der TMPK

Die Thymidinmonophosphatkinase (TMPK), welche die Phosphatübertragung von ATP zu TMP katalysiert, wurde semisynthetisch mittels *Expressed Protein Ligation* (EPL) hergestellt. Dadurch wurde eine Möglichkeit eröffnet die Aminosäuren des für die katalytische Aktivität wichtigen *P-loops* beliebig auszutauschen. So können nichtnatürliche Aminosäuren oder Fluoreszenzmarker in das Protein inkorporiert werden und zur Aufklärung des Mechanismus des Phosphatgruppentransfers genutzt werden.

Um dieses Ziel zu erreichen wurde das N-terminale Segment der TMPK durch Peptidfestphasensynthese (SPPS) hergestellt und durch die native chemische Ligation mit

dem C-terminalen Segment verknüpft. Nach erfolgter Rückfaltung des Proteins sollte die katalytische Aktivität der Kinase zurück gewonnen werden.

Die chemische Totalsynthese von Proteinen unterliegt trotz aller Fortschritte auf diesem Gebiet noch immer einiger Beschränkungen. So ist die Größe eines durch eine Totalsynthese erhaltenen Proteins aufgrund einer schlechten Kopplungs- oder Ligations-Effizienz auf etwa 180–200 Aminosäurereste limitiert (Dawson *et al.* 1994). Die Fortschritte in der Proteinexpression durch eine große Bandbreite an Expressionssystemen und Vektoren ermöglichen es heute Proteine nahezu beliebiger Größe zu erhalten. Allerdings hat die Totalsynthese einen Vorteil gegenüber der rekombinanten Expression. So können zum Beispiel Veränderungen am Protein zur biophysikalischen Charakterisierung, wie Fluoreszenzmarker oder artifizielle Aminosäuren entweder gar nicht in das Protein eingebaut werden, oder nicht ortsspezifisch über die Aminosäure-Seitenketten. Ebenso sind posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Lipidierung oder Glykosylierung, in den meisten Expressionssystemen nur bedingt möglich und müssen nachträglich in das Protein eingefügt werden.

Die Protein-Semisynthese vereint die Vorteile beider Strategien. Dabei wird das größere nicht zu verändernde Segment des Proteins rekombinant gewonnen und unterliegt theoretisch keiner Größenbeschränkung und das kleinere Segment, welches verändert werden soll, wird mithilfe von SPPS hergestellt und unterliegt nicht mehr der Beschränkung auf die 20 proteinogenen Aminosäuren (Romanelli *et al.* 2004).

So ist es möglich über semisynthetische Ansätze in Proteinen Modifikationen einzuführen, wie Methylierung (He *et al.* 2003), Pegylierung (Marsac *et al.* 2006) oder den Einbau von artifiziellen Aminosäuren (Zheng *et al.* 2005). Durch eine geeignete Strategie und Ligationsmethode ist es auch möglich N- oder C-terminale Modifikationen einzuführen, wie z. B. Marker, Tags oder Membrananker (Olschewski *et al.* 2007, Ludwig *et al.* 2006).

Die TMPK wurde ebenfalls über die Proteinemisynthese hergestellt. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf den *P-loop* des Enzyms gerichtet. Es wurde eine Methode entwickelt, um beliebige Modifikationen, wie artifizielle Aminosäuren oder Fluoreszenzmarker in das Enzym einbauen zu können.

Die Wahl der Ligationsmethode fiel auf die chemische native Ligation. Diese verläuft, wie schon in Abschnitt 4.1 angesprochen, unter milden Bedingungen in wässrigen Puffern und ist bioorthogonal zu den funktionellen Gruppen der Aminosäure-Seitenketten. Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist die Bildung einer nativen Peptidbindung.

Es gibt andere Strategien, um eine native Peptidbindung zu generieren. So können zwei Proteinsegmente beispielsweise über eine *traceless* Staudingerligation verknüpft werden, welche auf der Reduktionsreaktion von H. Staudinger basiert (Soellner *et al.* 2006; Staudinger und Meyer 1919). Allerdings muss in diesem Fall ebenso, wie bei der NCL, eine funktionelle Gruppe in das Protein eingeführt werden.

Da eine native Peptidbindung jedoch nicht zwangsläufig notwendig ist für ein aktives Protein, gibt es ebenso erfolgreiche Semisynthesen über Oximbrücken, der *Click*-Chemie oder Cycloadditionen, wie der Diels Alder-Reaktion (Cordes und Jencks 1962; Kolb *et al.* 2001; De Araujo *et al.* 2006).

Da für die NCL ein N-terminales Cystein nötig ist, musste aus den natürlich vorkommenden Cysteinen des Proteins eines als Ligationsstelle ausgewählt werden. Die Sequenz der TMPK enthält drei Cysteine in den Positionen 31, 117 und 163. Da der *P-loop* von den Resten 13–17 gebildet wird lag die Position 31 nahe. Das Peptid TMPK1-30 wurde mittels SPPS hergestellt (Schnölzer *et al.* 2007). Es gibt sowohl für die Boc-Strategie, als auch für die Fmoc-Strategie einige Methoden, um den C-terminalen α -Thioester herzustellen (Canne *et al.* 1995; Hackeng *et al.* 1997).

Die Ausbeute des Peptids betrug 4,7 %, bezogen auf den Synthesemaßstab und es wurde in hoher Reinheit erhalten. Eine biotinylierte Variante des Peptids mit einer Tev-Protease Erkennungssequenz lieferte lediglich eine Ausbeute von 0,5 %. Der Grund liegt in der höheren Hydrophobizität der zusätzlichen Aminosäuren. Ebenso steigerte der Biotinbaustein, trotz eines kurzen PEG-Linkers, die Hydrophobizität. Auch die Reinheit des Peptids entsprach nicht der des unmodifizierten Peptids. Es ergab sich eine Abbruchsequenz, welche durch RP-HPLC nicht abgetrennt werden konnte. Das Peptid wurde trotzdem verwendet, da die Abbruchsequenz schon vor der Biotinkopplung vorhanden war und somit nicht stört, da es nicht an Streptavidinbeads binden kann. Die Ausbeute könnte gesteigert werden, indem zum Beispiel der PEG-Linker weiter verlängert wird und somit das Peptid hydrophiler wird. Dies steigert jedoch den synthetischen Aufwand.

Der Reaktionspartner der Peptide für die NCL war das Segment TMPK31-212. Dieses längere Segment wurde durch rekombinante Expression erhalten. Das Konstrukt trug, in dieser Reihenfolge, ein Fragment der DNAK, einen Hexahistidintag, dann die Erkennungssequenz der Tev-Protease und zuletzt die TMPK31-212 mit dem Cystein an der Position 31. Aufgrund der schlechteren Löslichkeit der verkürzten TMPK wurde das Fusionskonstrukt in *inclusion bodies* exprimiert. Vermutlich wurde die Faltung des Proteinfragments durch die Verkürzung gestört. Nach erfolgter Aufreinigung über Ni-NTA-

Affinitätschromatographie in Chaotrop-enthaltenden Puffer wurde der Reinigungstag durch eine Tev-Proteolyse entfernt. Da die Tev-Protease C-terminal hinter ihrer Erkennungssequenz schneidet und nicht innerhalb der Erkennungssequenz, wie es zum Beispiel beim Thrombin der Fall ist, wird durch die Proteolyse gleichzeitig das N-terminale Cystein generiert (Tolbert und Wong 2002). Auf diesem Weg wurden aus einem Liter Kultur etwa 10 mg TMPK31-212 erhalten. Ähnliche Strategien wurden schon verwendet um Proteine wie das CrkII oder Ras herzustellen (Cotton und Muir 2000; Milic *et al.* 2008). Es gibt auch zahlreiche alternative Möglichkeiten ein N-terminales Cystein zu generieren. Im einfachsten Fall wird die N-terminale Aminosäure gegen ein Cystein ausgetauscht und das durch das Startcodon verursachte Methionin durch die Aminopeptidase proteolytisch entfernt (Gentle *et al.* 2004). Allerdings muss die Peptidase dafür quantitativ schneiden. Da das nicht immer der Fall ist, wurden andere effizientere Methoden entwickelt. So kann beispielsweise genau, wie ein C-terminaler Thioester auch das N-terminale Cystein über die Intein-Technologie generiert werden (Hackenberger *et al.* 2006). Diese Methode war aber in diesem Fall nicht möglich, da die schlechte Löslichkeit der verkürzten TMPK Chaotrop-haltige Puffer nötig macht, welche ein Spleißen des Inteins verhindern.

Die Ligation der beiden Fragmente TMPK1-30 und TMPK31-212 erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in 6 M Guanidinium mit Thiophenol als Ligationsvermittler. Die Ausbeute betrug dabei 56 %. Die Ausbeute könnte gesteigert werden, indem der Ligationsmischung Detergenz zugesetzt wird, um die Löslichkeit der Peptide weiter zu steigern. Das biotinylierte Peptid war schwerer löslich, als das unmodifizierte Peptid. Dadurch führten die gewählten Bedingungen in diesem Fall nicht zum Erfolg. Nach einem *Screening* der Ligationsbedingungen konnten aber auch für die modifizierte TMPK1-30 55 % Ausbeute erreicht werden. Die Bedingungen waren dabei 200 eq. MPAA, bezogen auf das Peptid, bei einem pH-Wert von 7,2 und einer Proteinkonzentration von 100 µM bei Raumtemperatur.

Die Reinigung des Ligationsproduktes TMPK1-212 und die Abtrennung des nicht umgesetzten Edukts TMPK31-212 wurde über HPLC und Gelfiltration versucht, blieb jedoch erfolglos. Daher wurde das Peptid TMPK1-30 mit dem Biotin modifiziert. Nach erfolgter Ligation sollte das Biotin-haltige Ligationsprodukt in Harnstoff-haltigen Puffer an Streptavidinbeads binden und das nicht umgesetzte Edukt durch Waschen entfernt werden. Anschließend sollte durch eine Tev-Proteolyse die TMPK1-212 freigesetzt werden. Nach einer ähnlichen Methode haben Magnin *et al.* (2008) mehrere G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) erfolgreich gereinigt. Nach anfänglichen Versuchen über Hexahistidin- und *Flagtags* hatten sie C-terminal eine Biotinylierungs-Domäne angefügt. Nach der

Expression in *P. pastoris* wurden die GPCR's *in vitro* biotinyliert und dann über Streptavidinbeads gereinigt. Anschließend wurden die N- und C-terminalen *tags* durch einen Tev-Verdau entfernt, wobei das Protein von den *beads* wieder freigesetzt wurde.

Der Unterschied zwischen dem hier gewählten Ansatz und dem von Magnin *et al.* war, dass die GPCRs nach ihrer Solubilisierung in 1 % n-Dodecyl β -D-Maltopyranosid (DDM) löslich vorlagen. Dadurch konnten sie an die Streptavidinbeads binden und durch die Tev-Protease in ihrem optimierten Chaotrop-freien Puffer verdaut werden. Im Fall der TMPK war aufgrund der schlechten Löslichkeit der TMPK31-212 bzw. TMPK1-212 eine Harnstoffkonzentration von bis zu 4 M im verwendeten Puffer nötig. Dies konnte das Streptavidin auf den *beads* denaturieren und die Bindungskapazität der *beads* herabsetzen. Zur Proteolyse wurde die Harnstoffkonzentration durch Dialyse auf 2 M herabgesetzt, bei der die Tev-Protease sich spontan zurückfaltet und ihre aktive Form wiedererlangt. Aber anstatt die TMPK zu verdauen hatte die Tev-Protease an die *beads* gebunden. Es konnte nicht nachgewiesen werden, ob die Biotin-TMPK teilweise geschnitten wurde. Die einzige Möglichkeit diese Strategie zum Erfolg zu führen wäre die Löslichkeit der TMPK1-212 zu steigern. Entweder durch Pegylierung des Peptids Biotin-TMPK1-30 oder durch die Zugabe von Detergenzien oder Lipiden zur Proteolyse. Zuvor muss allerdings geprüft werden, ob die Tev-Protease generell auf Streptavidinbeads aggregiert.

Nachdem diese Strategie fehlgeschlagen war, wurde zuletzt versucht über eine schrittweise Dialyse gegen Chaotrop-freien Puffer die TMPK zu reinigen. Dabei sollte das nicht umgesetzte Edukt präzipitieren und die TMPK1-212 so weit gefalten werden, dass sie in Lösung blieb. Dem Puffer wurden die beiden natürlichen Substrate der TMPK ATP und TMP zugesetzt, um einen Kern zu bilden um den herum sich das Protein falten sollte. Diese Strategie führte schon bei der Rückfaltung des rekombinanten denaturierten und eines synthetischen Ras-Proteins zum Erfolg (Zhang und Matthews 1998; DeLoskey *et al.* 1994; Becker *et al.* 2003). Das Edukt TMPK31-212 präzipitierte während der Dialyse und die TMPK1-212 verblieb weitestgehend in Lösung. Dieser Vorgang kann beliebig oft wiederholt werden und damit zu einer vollständigen Reinigung der TMPK1-212 führen.

Mit der gereinigten und mittels MALDI-MS charakterisierten TMPK wurde nach erneuter Denaturierung eine Rückfaltung durch Dialyse versucht. Dabei waren dem Puffer als Additiv unbedingt 5 mM DTT als reduzierendes Agens hinzuzufügen. Dies führte zu Rückfaltungsausbeuten von 84 % für die wtTMPK und von 30–50 % für die semisynthetische TMPK. Dies zeigt, dass im Falle der wtTMPK auch nach mehreren Stunden Inkubation mit Guanidiniumhydrochlorid noch gefaltene Kerndomänen bestehen müssen, welche die

anschließende Rückfaltung des Enzyms in seine aktive Form erheblich erleichtern. Die semisynthetisch hergestellte TMPK, welche aus der Peptidsynthese und der Expression in *inclusion bodies* völlig unstrukturiert hervorgeht hat diesen Vorteil nicht.

Die durch den gekoppelten Enzymtest bestimmte Umsatzkonstante k_{cat} für die humane wtTMPK beträgt $0,91 \text{ s}^{-1}$. Ostermann *et al.* (2000) ermittelten Konstanten von $0,36 \text{ s}^{-1}$ für die menschliche TMPK und Lavie *et al.* (1998) Werte von 35 s^{-1} für die Hefe-TMPK und 15 s^{-1} für die *E. coli*-TMPK. Der Unterschied um einen Faktor 2–3 in den gemessenen Geschwindigkeiten zwischen dieser Arbeit und den Arbeiten von Ostermann *et al.* beruht vermutlich auf der unterschiedlichen Reinigung des Proteins nach der Expression. Aufgrund der guten Erfahrungen mit DTT während der TMPK-Rückfaltung wurden in dieser Arbeit während des Thrombin-Verdau, um den GST-tag zu entfernen, 5 mM DTT zugegeben. In einer Expression und Reinigung ohne die Zugabe von DTT betrug die k_{cat} der wtTMPK lediglich $0,21 \text{ s}^{-1}$. Vermutlich neigen die drei Cysteine der TMPK-Sequenz zur Bildung von nicht nativen Disulfiden unter oxidativen Bedingungen.

Ein weiterer Aspekt, der dies stützt ist die beobachtete „Alterung“ des Enzyms. Eine ältere bei -80 °C gefrorene Probe wies nur noch einen k_{cat} -Wert von $0,71 \text{ s}^{-1}$ auf. Nach Denaturierung und Renaturierung mit 5 mM DTT im Rückfaltungspuffer wurde jedoch der alte Wert von etwa $0,9 \text{ s}^{-1}$ zurück erhalten.

Für die semisynthetische TMPK konnte ein Wert von $0,11 \text{ s}^{-1}$ erhalten werden. Dies entspricht einer Aktivität von 12 % verglichen mit der frisch präparierten wtTMPK. Daher ist anzunehmen, dass ein Großteil der TMPK zwar so weit gefalten wird, dass sie in Lösung bleibt, aber nicht in ihrer nativen aktiven Form vorliegt. Eine weitere Optimierung der Rückfaltungsbedingungen unter besonderer Beachtung der Redoxbedingungen im Puffer ist nötig.

Die Semisyntese der TMPK war erfolgreich. Die beiden Segmente TMPK1-30 und TMPK31-212 konnten in hoher Ausbeute und Reinheit erhalten werden. Die Ligation und die Reinigung des Ligationsproduktes verliefen zufrieden stellend. Im Folgenden sollten die Bedingungen zur Rückfaltung der semisynthetisch hergestellten TMPK weiter optimiert werden. Außerdem sollte der Effekt der Steigerung der Aktivität der menschlichen wtTMPK weiter untersucht werden. Durch die erfolgreiche Semisyntese der TMPK ist nun die Möglichkeit gegeben die Aminosäuren 1-30 beliebig durch künstliche Aminosäuren auszutauschen oder chemisch zu modifizieren und so der Aufklärung des Phosphatgruppentransfers von ATP zu TMP näher zu kommen

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Reihe von Protein-DNA-Konjugaten der Ypt-Protein-Familie hergestellt um mittels *DNA-directed immobilization* Protein-Mikroarrays zu erstellen. Dazu wurden alle elf Mitglieder der Ypt-Familie und ein Cherry-Ypt7-Konstrukt in Fusion mit einem C-terminalen Intein und einer Chitin-Bindungs-Domäne in *E. coli* überexprimiert und gereinigt. Inteinspaltung führte zur Bildung eines C-terminalen α -Thioesters. Acht der erhaltenen Konstrukte konnten erfolgreich für Ligationen mit Oligonukleotiden verwendet werden. Dazu wurden sieben verschiedene Oligonukleotide einer Länge von 19 bis 26 Nucleobasen an ihrem 5'-Ende mit einem Cystein modifiziert. Die Reaktionsbedingungen zur Ligation der Ypt-Proteine mit den Oligonukleotiden wurden optimiert und führten zu maximalen Reaktionsausbeuten von 60 %.

Unter diesen Reaktionsbedingungen gelang es, acht verschiedene Protein-DNA-Konjugate in ausreichenden Mengen für Mikroarray-Experimente herzustellen und nach Optimierung der Reinigungsstrategie in hoher Reinheit zu erhalten. Zur Charakterisierung der Protein-DNA-Konjugate mittels MALDI-MS wurde ein abgewandelter *Southernblot* entwickelt. Durch Hybridisierung mit einem biotinylierten Oligonukleotid konnten die Konjugate durch ein Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat als violette Bande nachgewiesen werden. Dieses Verfahren kann dazu verwendet werden, um Protein-DNA-Konjugate aus Protein-Lösungen heraus eindeutig nachzuweisen.

Nach der Immobilisierung der Protein-DNA-Konjugate auf DNA-Mikroarrays wurde der GDP-GTP-Austausch mit einem Fluoreszenz-markierten GTP am festen Träger optimiert. Dadurch gelang es einerseits die native Faltung der Ypt-Proteine nachzuweisen, andererseits sie in ihre aktive Form zu überführen und somit die Bindung von *downstream*-Effektoren zu ermöglichen.

Die Bindungseigenschaften des DSS4 an das Ypt1 wurden eingehend untersucht, wobei festgestellt wurde, dass durch die Immobilisierung des Ypt1 auf die feste Oberfläche die Bindungseigenschaften nicht beeinflusst und dass das Protein in seiner nativen Konformation vorlag.

Da mögliche Bindungspartner der Ypt-Proteine aus Hefe-Zellysaten heraus durch MALDI-MS nachgewiesen werden sollten, wurden die Messparameter und die Probenpräparation für MALDI-Messungen auf den Mikroarrays erfolgreich optimiert. Die Bindung des DSS4 an das Ypt1 wurde so erfolgreich detektiert.

Durch die effektive Herstellung von Protein-DNA-Konjugaten der Ypt-Familie, die Optimierung der Immobilisierung der Konjugate am festen Träger und die Überführung der immobilisierten Ypt-Proteine in ihre aktive Konformation, ist nun die Möglichkeit eröffnet Mikroarrays der gesamten Ypt-Protein-Familie zu bilden. Nun können in parallelen Ansätzen Bindungspartner der Proteine gefunden werden, um die komplexen vesikulären Transportnetzwerke besser zu verstehen. Außerdem bietet die Immobilisierung von Nukleotid-bindenden Protein am festen Träger die Möglichkeit Untersuchungen zu Enzym-Substrat-Wechselwirkungen durchzuführen.

In einem zweiten Projekt wurde die Thymidinmonophosphatkinase (TMPK) mittels *expressed protein ligation* hergestellt. Das N-terminale Segment TMPK1-30 wurde durch Peptidsynthese hergestellt und das C-terminale Segment TMPK31-212 konnte nach Expression in *E. coli* aus *inclusion bodies* gewonnen werden. Durch einen proteolytischen Verdau des exprimierten Konstruktes konnte die TMPK31-212 in hohen Ausbeuten und Reinheit erhalten werden. Dabei wurde gleichzeitig das notwendige N-terminale Cystein für eine NCL generiert. Die beiden Segmente wurden mittels nativer chemischer Ligation miteinander verknüpft und durch Zugabe der natürlichen Substrate ATP und TMP konnte die TMPK in eine aktive Konformation gefaltet werden. Dabei wurden allerdings nur 12 % der Aktivität der wtTMPK erreicht. Durch diese Methode können nahezu beliebige Modifikation, wie zum Beispiel nicht-natürliche Aminosäuren oder Fluoreszenzmarker in die TMPK1-30 eingeführt werden. Dadurch wird es möglich TMPK-Varianten zu erzeugen, welche einen Beitrag leisten den Phosphatgruppenübertragungsmechanismus der TMPK aufzuklären.

Summary

Endocytotic and exocytotic transport in eukaryotic cells through different compartments, is mediated by vesicles. The members of the Ypt-protein family are involved as regulating proteins in all steps of vesicular transport like forming of vesicles, targeting and fusing of vesicles with acceptor membranes. To identify binding partners of Ypt proteins, protein-DNA conjugates were synthesized and immobilized by DNA-directed immobilization on a DNA-microarray. Therefore the eleven members of Ypt family and a Cherry-Ypt7 construct were expressed in *E. coli* as fusion proteins with C-terminal intein and chitin binding domain. After purification *via* chitin beads the C-terminal α -thioester was formed by intein cleavage. Eight of the expressed constructs were successfully used for ligation reactions with oligonucleotides. Seven different oligonucleotides with 19 to 26 basepairs were modified at the 5'-end by cystein coupling. Reaction conditions for protein oligonucleotide ligations were optimized and gave best yields of 60 %.

After optimization of the purification, eight different protein DNA conjugates could be obtained in high purity and sufficient amounts for microarray experiments. Protein-DNA conjugates were unequivocally identified by a newly developed, modified Southernblot.

After immobilization of the conjugates on DNA microarrays a GDP/GTP exchange, using fluorescent GTP, was performed. Thus on the one hand native folding of the proteins were demonstrated, on the other hand proteins were activated, which allows subsequent binding of downstream effector proteins.

Binding properties of DSS4 and Ypt1 were studied in detail. They were not influenced by Ypt1 immobilization on microarrays. Detection of binding partners by MALDI-MS was successful in case of DSS4 and Ypt1. Extensive optimization of sample preparation and measurement conditions was necessary to obtain reliable results.

Effective formation of protein-DNA conjugates of the Ypt protein family, as well as optimization of protein immobilization and activation by nucleotide exchange on microarrays, enable construction of Ypt microarrays. This development will allow the identification of binding partners in parallel setups, for a better understanding of Ypt regulated vesicular transport network. Further immobilization of nucleotide binding proteins provides the opportunity for enzyme-substrate interaction analysis.

In a second project thymidylate monophosphate kinase (TMPK) was prepared by a expressed protein ligation approach. The N-terminal domain TMPK1-30 was prepared by peptide

synthesis and the larger C-terminal part TMPK31-212 was expressed in *E. coli*. and purified from inclusion bodies. Proteolytic digestion of a TMPK31-212 precursor gave the desired TMPK31-212 with an N-terminal cystein residue, required for native chemical ligation, in high yield and purity. Both segments were successfully ligated. Folding was achieved only after addition of the native substrates ATP and TMP. Thereby 12 % of wild type activity was obtained. This semisynthetic strategy allows any modification of TMPK1-30, like fluorescence labeling or introduction of non native amino acids. In this way variants can be created to study the phosphate transfer mechanism of TMPK.

6. Literatur

Allan B. B., Moyer B. D., Balch W. E. (2000). Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science*, **289**, 444–448.

Angenendt P., Glökler J., Murphy D., Lehrach H., Cahill D. J. (2002). Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials. *Anal. Biochem.*, **309**, 253-260.

Araki S., Kikuchi A., Hata Y., Isomura M., Takai Y. (1990). Regulation of reversible binding of smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein, to synaptic plasma membranes and vesicles by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor. *J. Biol. Chem.*, **265**, 13007-13015.

Arts E. J. und Wainberg M. A. (1996). Mechanisms of nucleoside analog antiviral activity and resistance during human immunodeficiency virus reverse transcription. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 527-540.

Bacon R. A., Salminen A., Ruohola H., Novick P., Ferro-Novick S. (1989). The GTP-binding protein Ypt1 is required for transport in vitro: The Golgi apparatus is defective in ypt1 mutants. *J. Cell Biol.*, **109**, 1015-1022.

Baker D., Wuestehube L., Schekman R., Botstein D., Segev N. (1990). GTP-binding Ypt1 protein and Ca²⁺ function independently in a cell-free transport reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 355-359.

Barbacid M. (1987). Ras Genes. *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 779-827.

Becker C. F. W., Hunter C. L., Seidel R. P., Kent S. B. H., Goody R. S., Engelhard M. (2001). A sensitive fluorescence monitor for the detection of activated Ras: total chemical synthesis of site-specifically labeled Ras binding domain of c-Raf1 immobilized on a surface. *Chemistry & Biology*, **8**, 243-252.

Becker C. F. W., Hunter C. L., Seidel R., Kent S. B. H., Goody R. S., Engelhard M. (2003). Total chemical synthesis of a functional interacting protein pair: The protooncogene H-Ras and the Ras-binding domain of its effector c-Raf1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100** (9), 5075–5080.

Becker C. F. W., Wacker R., Bouchen W., Seidel R., Kolaric B., Lang P., Schroeder H., Müller O., Niemeyer C. M., Spengler B., Goody R. S., Engelhard M. (2005). Direct Readout of Protein–Protein Interactions by Mass Spectrometry from Protein–DNA-Microarrays. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 7635–7639.

Becker C. F. W., Seidel R., Jahnz M., Bacia K., Niederhausen T., Alexandrov K., Schwiller P., Goody R. S., Engelhard M. (2006). C-Terminal Fluorescence Labeling of Proteins for Interaction Studies on the Single-Molecule Level. *ChemBioChem*, **7**, 891–895.

Benters R., Niemeyer C. M., Wöhrle D. (2001). Dendrimer – Activated Solid Supports for Nucleic Acid and Protein Microarrays. *ChemBioChem*, **2**, 686-694.

6. Literatur

- Berghäuser J. (1975). A reactive arginine in adenylate kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 370-376.
- Bock J. B., Matern H. T., Peden A. A., Scheller R. H. (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature*, **409**, 839-841.
- Boozer C., Ladd J., Chen S., Jiang S. (2006). DNA-directed protein immobilization for simultaneous detection of multiple analytes by surface plasmon resonance biosensor. *Analytical Chemistry*, **78**, 1515-1519.
- Bourne H. R. (1988). Do GTPases direct membrane traffic in secretion?. *Cell*, **53**, 669-671.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brundiens R., Lavie A., Veit T., Reinstein J., Schlichting I., Ostermann N., Goody R. S., Konrad M. (1999). Modifying human thymidylate kinase to potentiate azidothymidine activation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 35289-35292.
- Burgering B. M., Bos J. L. (1995). Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 18-22.
- Cady N. C., Stelick S., Batt C. A. (2003). Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. *Biosensors and Bioelectronics*, **19**, 59-66.
- Cai H., Zhang Y., Pypaert M., Walker L., Ferro-Novick S. (2005). Mutants in Trs120 disrupt traffic from the early endosome to the late Golgi. *J. Cell Biol.*, **171**, 823-833.
- Canne L. E., Walker S. M., Kent S. B. H. (1995). A general method for the synthesis of thioester resin linkers for use in the solid phase synthesis of peptide- α -thioacids. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1217-1220.
- Caruso M. and Klatzmann D. (1994). Genetically controlled pharmacomodulation for HIV gene therapy. *C. R. Acad. Sci. Paris Sci. Vie/Life Sci.*, **317**, 1027-1030.
- Cordes E. H., Jencks W. P. (1962). On the Mechanism of Schiff Base Formation and Hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **84** (5), 832-837.
- Cotton G. J. and Muir T. W. (2000). Generation of a dual-labeled fluorescence biosensor for Crk-II phosphorylation using solid-phase expressed protein ligation. *Chemistry & Biology*, **7**, 253-261.
- Dawson P. E., Muir T. W., Clark-Lewis I., Kent S. B. H. (1994). Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, **266**, 776-779.

- Dawson P. E., Churchill M. J., Ghadiri M. R., Kent S. B. (1997). Modulation of reactivity in Native Chemical Ligation through the use of thiol Additives. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 4325–4329.
- De Araujo A. D., Palomo J. M., Cramer J., Köhn M., Schröder H., Wacker R., Niemeyer C., Alexandrov K., Waldmann H. (2006). *Angew. Chem.*, **118**, 302–307.
- DeLoskey R. J., Van Dyk D. E., Van Aken T. E., Campbell-Burk S. (1994). Isolation and Refolding of H-ras from Inclusion Bodies of Escherichia coli: Refold Procedure and Comparison of Refolded and Soluble H-ras. *Arch. Biochem. Biophys.*, **311**, 72–78.
- Detter J. C., Zhang Q., Mules E. H., Novak E. K., Mishra V. S., Li W., McMurtrie E. B., Tchernev V. T., Wallace M. R., Seabra M. C., Swank R. T., Kingsmore S. F. (2000). Rab geranylgeranyl transferase alpha mutation in the gunmetal mouse reduces Rab prenylation and platelet synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 4144–4149.
- Duckworth B. P., Xu J., Taton T. A., Guo A., Distefano M. D. (2006). Site-Specific, Covalent Attachment of Proteins to a Solid Surface. *Bioconjugate Chem.*, **17**, 967–974.
- Durek T., Torbeev V. Y., Kent S. B. (2007). Convergent chemical synthesis and high-resolution x-ray structure of human lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**, 4846–4851.
- Fang Y., Frutos A. G., Lahiri J. (2002). Membrane protein microarrays. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2394–2395.
- Feldkamp U., Rauhe H., Banzhaf W. (2003). Genetic Programming and Evolvable Machines. *Springer*, **4**, 153. <http://ls11-www.cs.uni-dortmund.de/molcomp/Downloads/downloads.html>.
- Feldkamp U., Wacker R., Schroeder H., Banzhaf W., Niemeyer C. M. (2004). Microarray-Based in vitro Evaluation of DNA Oligomer Libraries Designed in silico. *ChemPhysChem*, **5**, 367–372.
- Fleming A (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *Br. J. Exp. Pathol.*, **10 (31)**, 226–36.
- Gavin I. M., Kukhtin A., Glesne D., Schabacker D., Chandler D. P. (2005). Analysis of protein interaction and function with a 3-dimensional MALDI-MS protein array. *BioTechniques*, **39 (1)**, 2-8.
- Gentle I. E., De Souza D. P., Baca M. (2004). Direct Production of Proteins with N-Terminal Cysteine for Site-Specific Conjugation. *Bioconjugate Chem.*, **15**, 658–663.
- Glynou K., Ioannou P. C., Christopoulos T. K. (2003). Affinity Capture-Facilitated Preparation of Aequorin-Oligonucleotide Conjugates for Rapid Hybridization Assays. *Bioconjugate Chem.*, **14**, 1024–1029.

6. Literatur

Goud B., Salminen A., Walworth N. C., Novick P. J. (1988). A GTP-binding protein required for secretion rapidly associates with secretory vesicles and the plasma membrane in yeast. *Cell*, **53**, 753-768.

Govindaraju T., Jonkheijm P., Gogolin L., Schroeder H., Becker C. F. W., Niemeyer C. M., Waldmann H. (2008). Surface immobilization of biomolecules by click sulfonamide reaction. *Chem. Commun.*, 3723–3725.

Grandjean C., Boutonnier A., Guerreiro C., Fournier J.-M., Mulard L. A. (2005). On the preparation of carbohydrate-protein conjugates using the traceless staudinger ligation. *J. Org. Chem.*, **70**, 7123-7132.

Gregory S. G., Barlow K. F., McLay K. E. *et al.* (2006). The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature*, **441**, 315-321.

Griscelli C. and Prunieras M. (1978). Pigment dilution and immunodeficiency: a new syndrome. *Int. J. Dermatol.*, **17**, 788–791.

Haase C. and Seitz O. (2008). Mehr Spielraum für die native chemische Peptidkupplung. *Angew. Chem.*, **120**, 1575–1579.

Hackenberger C. P. R., Chen M., Imperiali B. (2006). Expression of N-terminal Cys-protein fragments using an intein refolding strategy. *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 5043–5048.

Hackeng T. M., Mounier C. M., Bon C., Dawson P. E., Griffin J. H., Kent S. B. H. (1997). Total chemical synthesis of enzymatically active human type II secretory phospholipase A2. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 7845-7850.

Hall D. A., Zhu H., Zhu X., Royce T., Gerstein M., Snyder M. (2004). Regulation of gene expression by a metabolic enzyme. *Science*, **306**, 482-484.

Halpin D. R., Lee J. A., Wrenn S. J., Harbury P. B. (2004). DNA Display III. Solid-Phase organic synthesis on unprotected DNA. *PLoS Biology*, **2** (7), 1031-1038.

Hancock J. F., Paterson H., Marshall C. J. (1990). A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell*, **63**, 133-139.

Haubruck H., Prange R., Vorgias C., Gallwitz D. (1989). The ras-related mouse ypt1 protein can functionally replace the YPT1 gene product in yeast. *The EMBO J.*, **8**, 1427-1432.

He S., Bauman D., Davis J. S., Loyola A., Nishioka K., Gronlund J. L., Reinberg D., Meng F., Kelleher N., McCafferty D. G. (2003). Facile synthesis of site-specifically acetylated and methylated histone proteins: Reagents for evaluation of the histone code hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 12033–12038.

6. Literatur

- Heckenlively J. R. and Bird A. C. (1988). In Retinitis Pigmentosa. *J.B. Lippincott Co., New York*, 176–187.
- Heintz D., Wurtz V., High A. A., Dorselaer A. V., Reski R., Sarnighausen E. (2004). An efficient protocol for the identification of protein phosphorylation in a seedless plant, sensitiv enough to detect members of signaling cascades. *Electrophoresis*, **25**, 1149-1159.
- Humenik M., Huang Y., Wang Y., Sprinzl M. (2007). C-Terminal Incorporation of Bio-Orthogonal Azide Groups into a Protein and Preparation of Protein–Oligodeoxynucleotide Conjugates by CuI-Catalyzed Cycloaddition. *ChemBioChem*, **8**, 1103–1106.
- Itzen A., Rak A., Goody R. S. (2007). Sec2 is a Highly Efficient Exchange Factor for the Rab Protein Sec4. *J. Mol. Biol.*, **365**, 1359–1367.
- Jedd G., Richardson C. J., Litt R. J., Segev N. (1995). The Ypt1 GTPase is essential for the first two steps of the yeast secretory pathway. *J. Cell Biol.*, **131**, 583-590.
- John J., Sohmen R., Feuerstein J., Linke R., Wittinghofer A., Goody R. S. (1990). Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry*, **29**, 6059-6065.
- Jones S., Newman C., Liu F., Segev, N. (2000). The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 4403–4411.
- Kapust R. B., Tózsér J., Fox J. D., Anderson D. E., Cherry S., Copeland T. D., Waugh D. S. (2001). Tobacco etch virus protease: Mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Prot. Eng.*, **14**, 993-1000.
- Klein C. N., Philippe N., Le Deist F., Fraitag S., Prost C., Durandy A., Fischer A., Griscelli C. (1994). Partial albinism with immunodeficiency (Griscelli syndrome). *J. Pediatr.*, **125**, 886–895.
- Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B. (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 2004-2021.
- Kozlov I. A., Melnyk P. C., Stromborg K. E., Chee M. S., Barker D. L., Zhao C. (2004). Efficient strategies for the conjugation of oligonucleotides to antibodies enabling highly sensitive protein detection. *Biopolymers*, **73**, 621-630.
- Kukolka F. and Niemeyer C. M. (2004). Synthesis of fluorescent oligonucleotide–EYFP conjugate: Towards supramolecular construction of semisynthetic biomolecular antennae. *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 2203–2206.

Kutay U., Hartmann E., Treichel N., Calado A., Carmo-Fonseca M., Prehn S., Kraft R., Goerlich D., Bischoff F. R. (2000). Identification of Two Novel RanGTP-binding Proteins Belonging to the Importin β Superfamily. *J. B. C.*, **275** (51), 40163–40168.

Lamtore J. B., Beattie K. L., Burke B. E., Eggers M. D., Ehrlich D. J., Fowler R., Hollis M. A., Kosicki B. B., Reich R. K., Smith S. R. (1994). Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device. *Nucleic acids research*, **22**(11), 2121-2125.

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, **227**, 680-685.

Kalia J., Abbott N. L., Raines R. T. (2007). General Method for Site-Specific Protein Immobilization by Staudinger Ligation. *Bioconjugate Chem.*, **18**, 1064-1069.

Lavie A., Ostermann N., Brundiers R., Goody R. S., Reinstein J., Konrad M., Schlichting, I. (1998). Structural basis for efficient phosphorylation of 3'-azidothymidine monophosphate by Escherichia coli thymidylate kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 14045–14050.

Leary J. J., Brigati D. J., Ward D. C. (1983). Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotinlabeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 4045-4049.

Lee Y., Lee E. K., Cho Y. W., Matsui T., Kang I.-C., Kim T.-S., Han M. H. (2003). Proteochip: A highly sensitive protein microarray prepared by a novel method of protein immobilization for application of protein-protein interaction studies. *Proteomics*, **3**, 2289-2304.

Lesaichere M.-L., Lue R. Y. P., Chen G. Y. J., Zhu Q., Yao S. Q. (2002). Intein-mediated biotinylation of proteins and its application in a protein microarray. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 8768-8769.

Li Y., Zhang Y., Yan H. (1996). Kinetic and thermodynamic characterizations of yeast guanylate kinase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 28038-28044.

Lovrinovic M., Seidel R., Wacker R., Schroeder H., Seitz O., Engelhard M., Goody R. S., Niemeyer C. M. (2003). Synthesis of protein–nucleic acid conjugates by expressed protein ligation. *Chem. Commun.*, 822–823.

Lovrinovic M., Spengler M., Deutsch C., Niemeyer C. M. (2005). Synthesis of covalent DNA-protein conjugates by expressed protein ligation. *Mol. BioSyst.*, **1**, 64-69.

Lovrinovic M. and Niemeyer C. M. (2005). Rapid synthesis of DNA–cysteine conjugates for expressed protein ligation. *Biochemical and Biophysical Res. Commun.*, **335**, 943–948.

6. Literatur

Ludwig C., Pfeiff M., Linne U., Mootz H. D. (2006). Ligation of a Synthetic Peptide to the N- Terminus of a Recombinant Protein Using Semisynthetic Protein *trans*-Splicing. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45(31)**, 5218–5221.

Magnin T., Fiez-Vandal C., Potier N., Coquard A., Leray I., Steffan T., Logez C., Alkhalfioui F., Pattus F., Wagner R. (2008). A novel, generic and effective method for the rapid purification of G protein-coupled receptors. *Protein Expression and Purification*, **64**, 1–7.

Marsac Y., Cramer J., Olschewski D., Alexandrov K., Becker C. F. W. (2006). Site-Specific Attachment of Polyethylene Glycol-like Oligomers to Proteins and Peptides. *Bioconjugate Chem.* **17**, 1492-1498.

McBeath G., Schreiber S. L. (2000). Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, **289**, 1760-1763.

Mcgall G., Labadie J., Brock P., Wallraff G., Nguyen T., Hinsberg W. (1996). Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93 (24)**, 13555-13560.

Meienhofer J., Schnabel E., Bremer H., Brinkhoff O., Zabel R., Sroka W., Klostermeyer H., Brandenburg D., Okuda T., Zahn H. (1963). Synthese der Insulinketten und ihre Kombination zu insulinaktiven Präparaten. *Z. Naturforsch.*, **18b**, 1120–1121.

Merrifield R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. 1. Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2156.

Milic J., Seidel R., Becker C. F. W., Goody R. S., Engelhard M. (2008). Semisynthesis of H-Ras with a glutamic acid methylester at position 61. *Pept. Sci.*, **90**, 399–405.

Miranda L. P., Jones A., Meutermans W. D. F., Alewood P. F. (1998). p-Cresol as a reversible Acylium ion scavenger in Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1410-1420.

Muir T., Sondhi D., Cole P. A. (1998). Expressed protein ligation: A general method for protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95 (12)**, 6705-6710.

Muir T. W. (2003). Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation. *Annual Review of Biochemistry*, **72**, 249-289.

Neuhard D. J. and Nygaard P. (1987). Biosynthesis and conversation of nukleotides. *Cellular and molecular biology*, 445-447.

Niemeyer C. M., Sano T., Smith C. L., Cantor C. R. (1994). Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA-streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates. *Nucleic Acids Research*, **22 (25)**, 5530-5539.

6. Literatur

Okamoto T., Suzuki T., Yamamoto N. (2000). Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology. *Nature biotechnology*, **18**(4), 438-441.

Olejnik J., Lüdemann H. C., Krzymanska-Olejnik E., Berkenkamp S., Hillenkamp F., Rothschild K. (1999). Photocleavable peptide-dna conjugates: synthesis and applications to DNA analysis using MALDI-TOF. *Nucleic Acids Research*, **27** (23), 4626-4631.

Olschewski D. Seidel R., Miesbauer M., Rambold A. S., Oesterhelt D., Winklhofer K. F., Tatzelt J., Engelhard M., Becker C. F. W. (2007). Semisynthetic Murine Prion Protein Equipped with a GPI Anchor Mimic Incorporates into Cellular Membranes. *Chemistry & Biology*, **14**, 994-1006.

Ostermann N., Lavie A., Padiyar S., Brundiers R., Veit T., Reinstein J., Goody R. S., Konrad M., Schlichting I. (2000). Potentiating AZT Activation: Structures of Wild-type and Mutant Human Thymidylate Kinase Suggest Reasons for the Mutants' Improved Kinetics with the HIV Prodrug Metabolite AZTMP. *J. Mol. Biol.*, **304**, 43-53.

Ozyhar A. and Kiltz H. H. (1991). High-resolution gel filtration of the ecdysteroid receptor- DNA complex - an alternative to the electrophoretic mobility shift assay. *J. Chrom.*, 11-17.

Patel N., Davies M. C., Hartshorne M., Heaton R. J., Roberts C. J., Tendler S. J. B., Williams P. M. (1997). Immobilization of Protein Molecules onto Homogeneous and Mixed Carboxylate-Terminated Self-Assembled Monolayers. *Langmuir*, **13**, 6485-6490.

Pritz S., Kraetke O., Klose A., Klose J., Rothemund S., Fechner K., Bienert M., Beyermann M. (2008). Synthesis of Protein Mimics with Nonlinear Backbone Topology by a Combined Recombinant, Enzymatic, and Chemical Synthesis Strategy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 3642-3645.

Pylypenko O., Rak A., Durek T., Kushnir S., Dursina B. E., Thomae N. H., Constantinescu A. T., Brunsveld L., Watzke A., Waldmann H., Goody R. S., Alexandrov K. (2006). Structure of doubly prenylated Ypt1:GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling. *The EMBO Journal*, **25**, 13-23.

Qian M., Bui T., Ho R. J. Y., Unadkat J. D. (1994). Metabolism of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) in human placental Trophoblasts and Hofbauer cells. *Biochem. Pharmac.*, **48**, 383-389.

Ramachandran N., Hainsworth E., Bhullar B., Eisenstein S., Rosen B., Lau A. Y., Walter Y. C., LaBaer J. (2004). Self-assembling protein microarrays. *Science*, **305**, 86-90.

Rak A., Pylypenko O., Durek T., Watzke A., Kushnir S., Brunsveld L., Waldmann H., Goody R. S., Alexandrov K. (2003). Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase. *Science*, **302**, 646-650.

6. Literatur

- Reddy M. P., Hanna N. B., Farooqui F. (1994). Fast Cleavage and Deprotection of Oligonukleotides. *Tetrahedron Letters*, **35** (25), 4311-4314.
- Reinstein J., Brune M., Wittinghofer A. (1988). Mutations in the Nucleotide Binding Loop of Adenylate Kinase of *Escherichia coli* *Biochemistry*, **27**, 4712-4720.
- Romanelli A., Shekhtman A., Cowburn D., Muir T. W. (2004). Semisynthesis of a segmental isotopically labeled protein splicing precursor: NMR evidence for an unusual peptide bond at the N-extein-intein junction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 6397-6402.
- Rubina A. Y., Dementieva E. I., Stomakhin A. A., Darii E. L., Pankov S. V., Barsky V. E., Ivanov S. M., Konovalova E. V. et al. (2003). Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications. *BioTechniques*, **34**, 1008-1022.
- Sacher M., Barrowman J., Wang W., Horecka J., Zhang Y., Pypaert M., Ferro-Novick S. (2001). TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport. *Mol. Cell*, **7**, 433-442.
- Sakakibara S. (1999). Chemical Synthesis of Proteins in Solution. *Biopolymers*, **51**, 279-296.
- Salminen A., Novick P., (1987). A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell*, **49**, 527-538.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 5463-5467.
- Sarin V. K., Kent S. B. H., Tam J. P., Merrifield R. B. (1981). Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction. *Analyt. Biochem.*, **117**, 147-157.
- Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**, 467-470.
- Schnölzer M., Alewood P., Jones A., Alewood D., Kent S. B. (1992). In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. Rapid, high yield assembly of difficult sequences. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **40**, 180-193.
- Schroeder H., Ellinger B., Becker C. F. W., Waldmann H., Niemeyer C. M. (2007). Generation of live-cell microarrays by means of DNA-Directed immobilization of specific cell-surface ligands. *Angew. Chemie Int. ed.*, **46** (22), 4180-4183.
- Schumacher J., Randles J. W., Riesner D. (1983). A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Anal. Biochem.*, **135**, 288-295.

6. Literatur

- Seabra M.C. (1996). New insights into the pathogenesis of choroideremia: a tale of two REPs. *Ophthalm. Genet.*, **17**, 43–46.
- Seabra M. C. (2000). Biochemistry of Rab geranylgeranyl transferase. In *Lipid Modifications of Proteins*. Edited by Tamanoi FA and Sigman DS, *Academic Press*, 131-154.
- Segev N. (2001). Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 500-511.
- Segev N., Mulholland J., Botstein D. (1988). The yeast GTP-binding YPT1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery. *Cell*, **52**, 915-924.
- Shen F, Seabra M. C. (1996). Mechanism of digeranylgeranylation of Rab proteins. Formation of a complex between monogeranylgeranyl-Rab and Rab escort protein. *J. Biol. Chem.*, **271**, 3692-3698.
- Sheng X. R., Li X., Pan X. M. (1999). An iso-random Bi Bi mechanism for adenylate kinase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 22238-22242.
- Short B., Haas A., Barr F.A. (2005). Golgins and GTPases, giving identity and structure to the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta*, **1744**, 383–395.
- Shorter J. and Warren G. (2002). Golgi architecture and inheritance. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **18**, 379–420.
- Silman I., Katchalski E. (1966). Water-insoluble derivatives of enzymes, antigens, and antibodies. *Annu. Rev. Biochem.*, **35**, 873-908.
- Soellner M. B., Tam A., Raines R. T. (2006). Staudinger Ligation of Peptides at Non-Glycyl Residues. *J. Org. Chem.*, **71**, 9824 – 9830.
- Southern E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.
- Spengler B. (2004). De Novo Sequencing, Peptide Composition Analysis, and Composition-Based Sequencing: A New Strategy Employing Accurate Mass Determination by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **15**, 703–714.
- Staudinger H. and Meyer J. (1919). Ueber neue organische Phosphorverbindungen II. Phosphazine *Helvetica Chimica Acta*, **2** (1), 619-635.
- Stenmark H., Valencia A., Martinez O., Ullrich O., Goud B., Zerial M. (1994). Distinct structural elements of rab5 define its functional specificity. *The EMBO J.*, **13**, 575-583.

Su J. and Mrksich M. (2002). Using Mass Spectrometry to Characterize Self-Assembled Monolayers Presenting Peptides, Proteins, and Carbohydrates. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 4715–4718.

Suvorova E. S., Duden R., Lupashin V. V. (2002). The Sec34/ Sec35p complex, a Ypt1p effector required for retrograde intra- Golgi trafficking, interacts with Golgi SNAREs and COPI vesicle coat proteins. *J. Cell Biol.*, **157**, 631–643.

Syed N., Smith J. E., John S. K., Seabra M. C., Aguirre G. D., Milam A. H. (2001). Evaluation of retinal photoreceptors and pigment epithelium in a female carrier of choroideremia. *Ophthalmology*, **108**, 711–720.

Takai Y., Sasaki T., Matozaki T. (2004). Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.*, **81**, 153-208.

Takeda S., Tsukiji S., Nagamune T. (2004). Site-specific conjugation of oligonucleotides to the C-terminus of recombinant protein by expressed protein ligation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **14**, 2407-2410.

Tam J. P. and Merrifield R. B. (1985). Solid-Phase Synthesis Of Gastrin-I-Comparison Of Methods Utilizing Strong Acid For Deprotection And Cleavage. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **26**, 262-273.

Tang N., Tornatore P., Weinberger S. R. (2004). Current developments in SELDI affinity technology. *Mass spectrometry reviews*, **23 (1)**, 34–44.

Tolbert T. J. and Wong C.-H. (2002). New Methods for Proteomic Research: Preparation of Proteins with N-Terminal Cysteines for Labeling and Conjugation. *Angew. Chm. Int. Ed.*, **41 (12)**, 2171-2174.

Törnevik Y., Ullman B., Balzarini J., Wahren B., Eriksson S. (1995). Cytotoxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine correlates with 3'-azidothymidine-5'-monophosphate (AZTMP) levels, whereas anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity correlates with 3'-azidothymidine 5'-triphosphate (AZTTP) levels in cultured CEM T-lymphoblastoid cells. *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 829-837.

Towbin H. Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 4350–4354.

Uttamchandani M., Chen G. Y. J., Lesaichere M.-L., Yao S. Q. (2004). Site-specific peptide immobilization strategies for the rapid detection of kinase activity on microarrays. *Methods in Molecular Biology*, **264**, 191-204.

Villain M., Vizzavona J, Rose K. (2001). Covalent capture : a new tool for the purification of synthetic and recombinant polypeptides. *Chemistry & Biology*, **8**, 673-679.

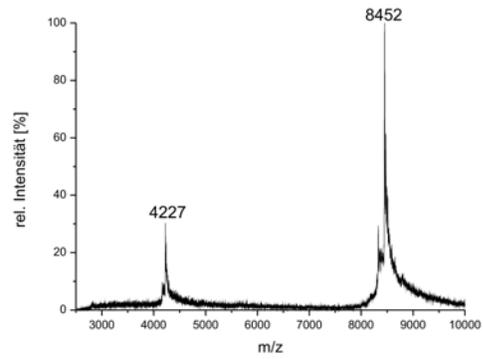
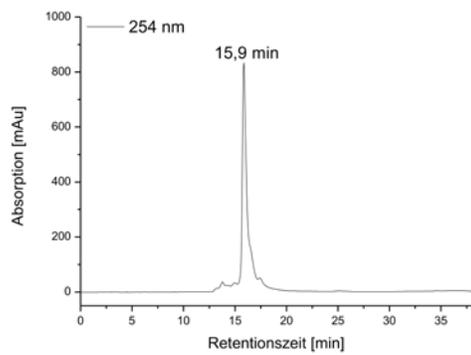
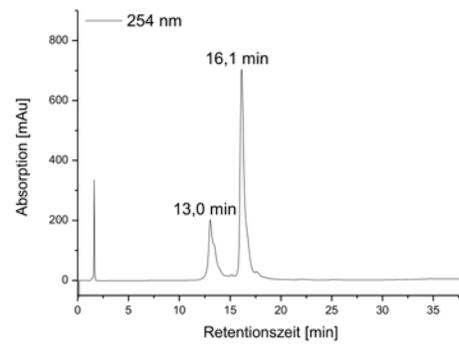
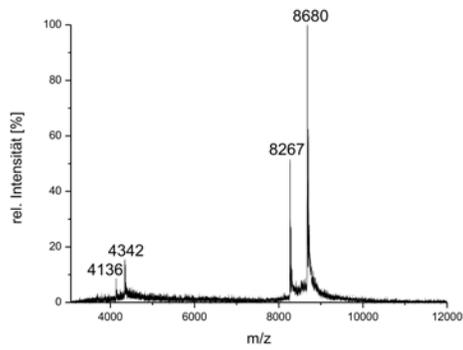
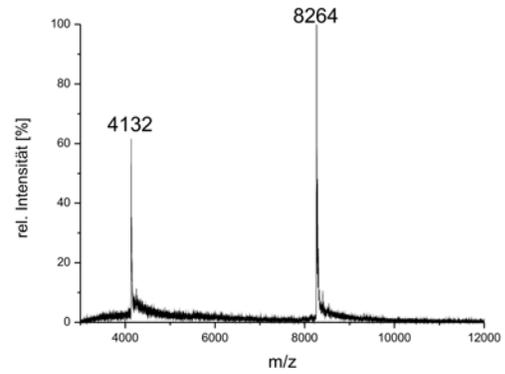
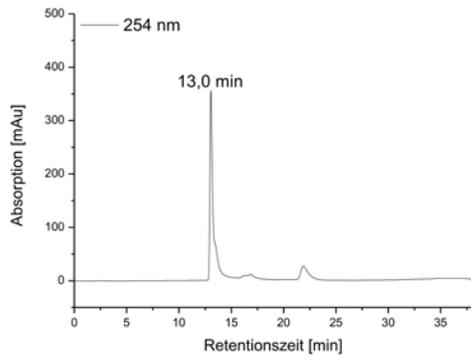
Wacker R. and Niemeyer C. M. (2004). DDI-FIA—A Readily Configurable Microarray-Fluorescence Immunoassay Based on DNA-Directed Immobilization of Proteins *ChemBioChem*, **5**, 453-459.

6. Literatur

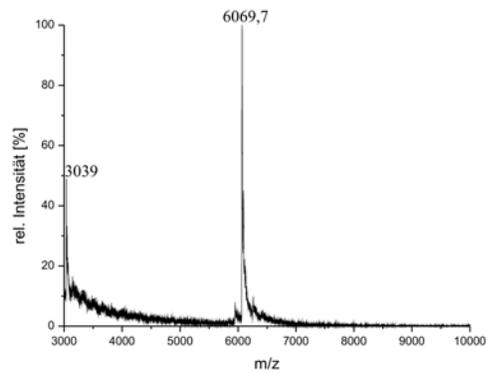
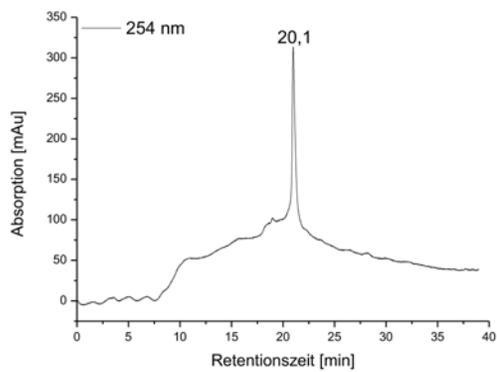
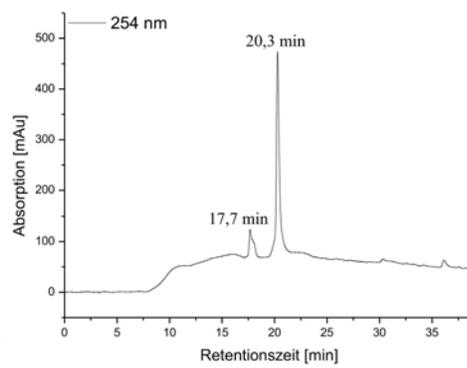
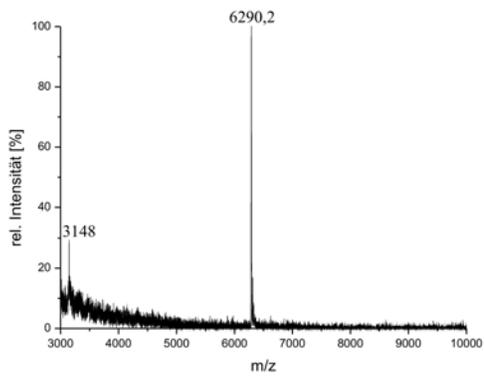
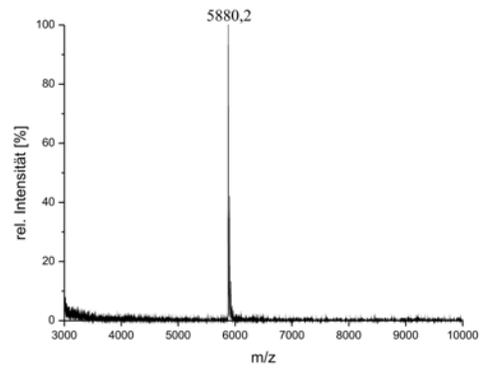
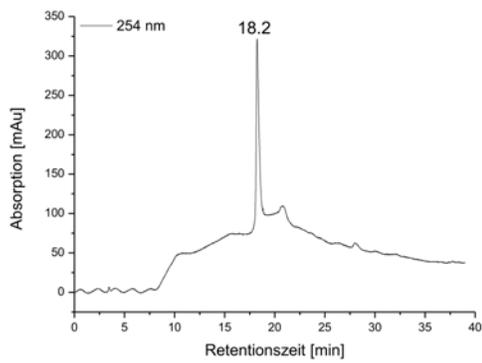
- Watzke A., Köhn M., Gutierrez-Rodriguez M., Wacker R., Schröder H., Breinbauer R., Kuhlmann J., Alexandrov K., Niemeyer C. M., Goody R. S., Waldmann H. (2006). Site-selective protein immobilization by Staudinger Ligation. *Angew. Chemie*, **118**, 1436-1440.
- Wieland T., Bokelman E., Bauer L., Lang H. U., Lau H. (1953). Bildung von S-haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten. *Liebigs Ann. Chem.*, **583**, 129-149.
- Will D. W., Breipohl G., Langner D., Knolle J., Uhlmann E. (1995). The synthesis of polyamide nucleic acids using a novel monomethoxytrityl protecting-group strategy *Tetrahedron*, **51 (44)**, 12069-12082.
- Wu K. J., Stedingt A., Becker C. H. (1993). Matrix-assisted Laser Desorption Time-of-flight Mass Spectrometry of Oligonucleotides Using 3-Hydroxypicolinic Acid as an Ultraviolet-sensitive Matrix. *Rapid Commun. Mass. Spectr.*, **7**, 142-146.
- Wu Y.-W., Oesterlin L. K., Tan K.-T., Waldmann H., Alexandrov K., Goody R. S., (2010). Membrane targeting mechanism of Rab GTPases elucidated by semisynthetic protein probes. *Nature Chemical Biology*, **6 (7)**, 534-540.
- Yam C. M., Deluge M., Tang D., Kumar A., Cai C. (2006). Preparation, characterization, resistance to protein adsorption, and specific avidin–biotin binding of poly(amidoamine) dendrimers functionalized with oligo(ethylene glycol) on gold. *Colloid Interface Sci.*, **296**, 118–130.
- Zerial M. and McBride H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 107–117.
- Zhang J., Matthews C. R. (1998). Ligand Binding Is the Principal Determinant of Stability for the p21H-ras Protein. *Biochemistry*, **37**, 14881–14890.
- Zheng W., Schwarzer D., Lebeau A., Weller J. L., Klein D. C., Cole P. A. (2005). Cellular Stability of Serotonin N-Acetyltransferase Conferred by Phosphonodifluoromethylene Alanine (Pfa) Substitution for Ser-205. *J. Biol. Chem.*, **280**, 10462–10467.
- Zhu H., Klemic J. F., Chang S., Bertone P., Casamayor A., Klemic K. G., Smith D., Gerstein M., Reed M. A., Snyder M. (2000). Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nature Genetics*, **26**, 283-289.
- Zhu H., Bilgin M., Bangham R., Hall D., Casamayor A., Bertone P., Lan N., Jansen R., Bindlingmeier S., Houfek T., Mitchell T., Miller P., Dean R. A., Gerstein M., Reed M. A., Snyder M. (2001). Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, **293**, 2101-2105.
- Zimmermann T. P., Mohany W. B., Prus K. L. (1987). 3'-Azido-3'-deoxythymidine. An unusual nucleoside analogue that permeates the membrane of human erythrocytes and lymphocytes by nonfacilitated diffusion. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5748-5754.

7. Anhang

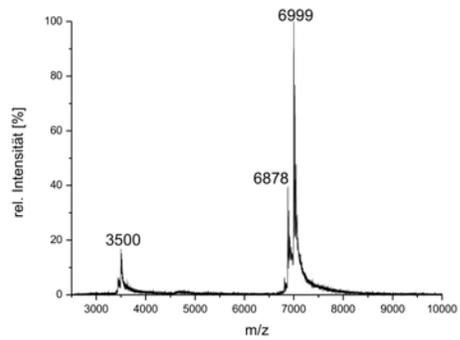
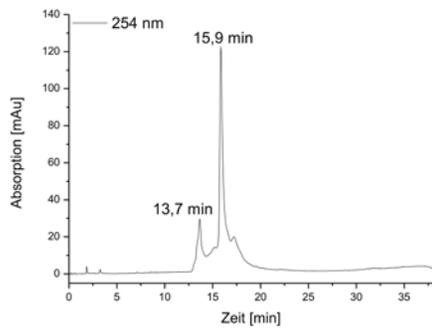
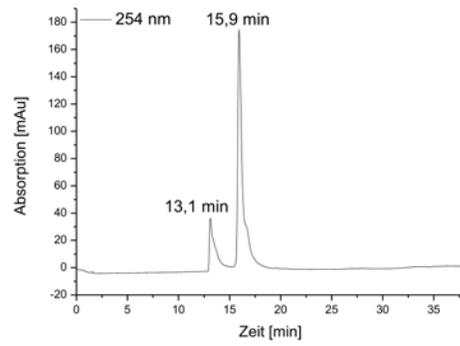
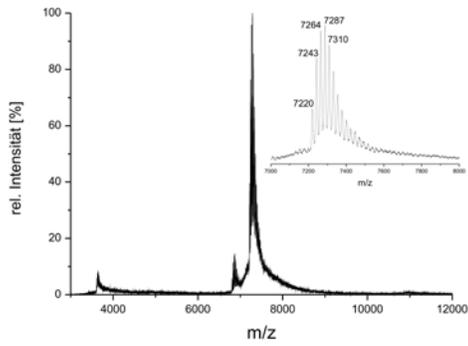
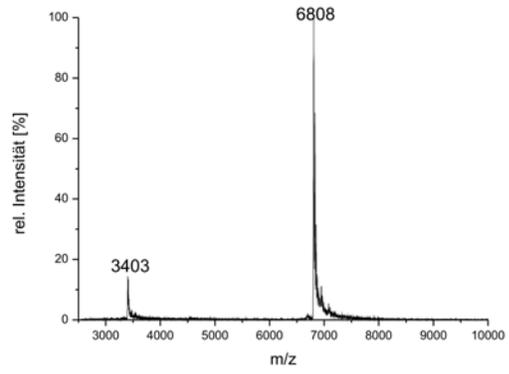
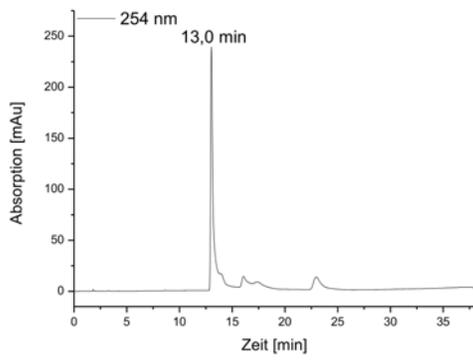
7.1: Cys-Oligonukleotid C



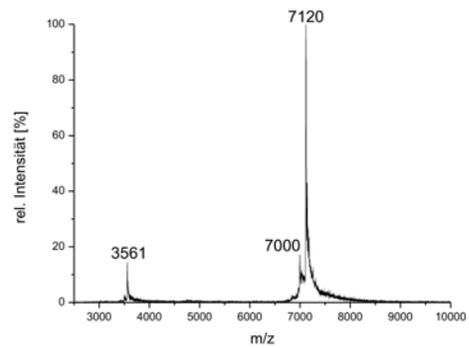
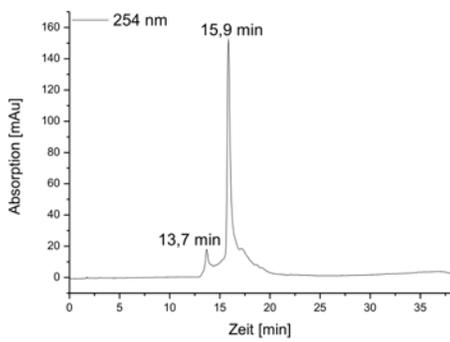
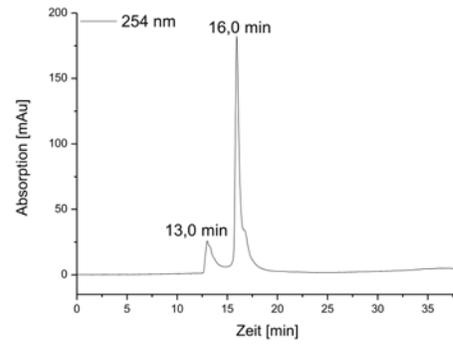
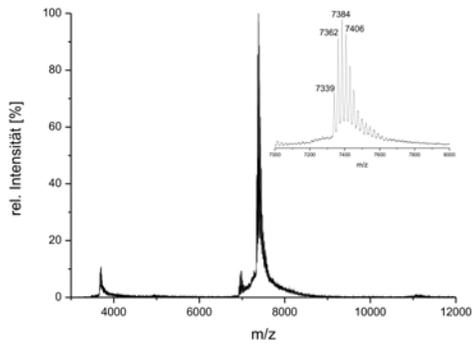
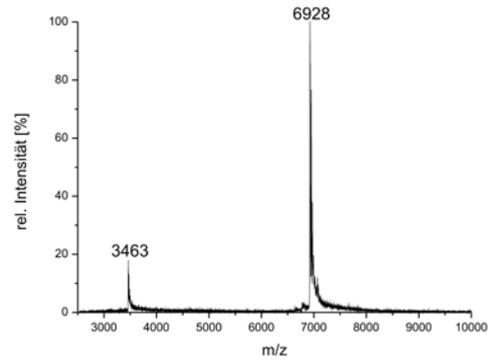
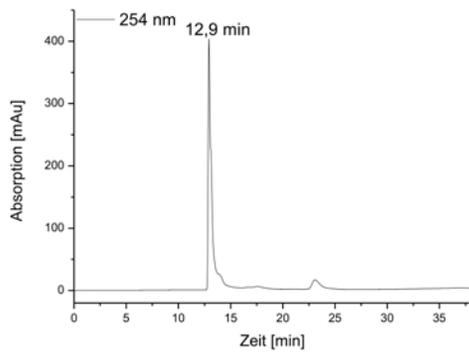
7.2: Cys-Oligonukleotid D



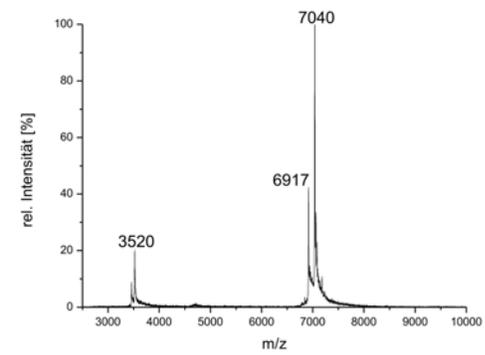
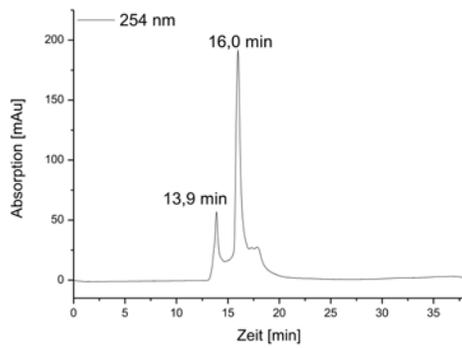
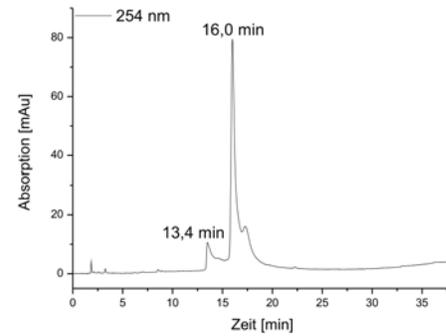
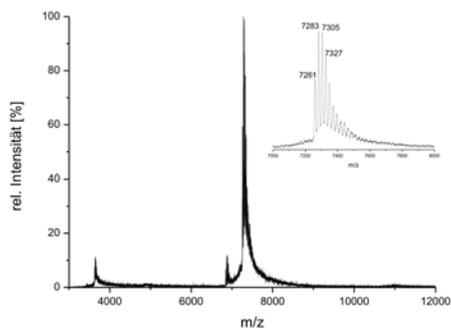
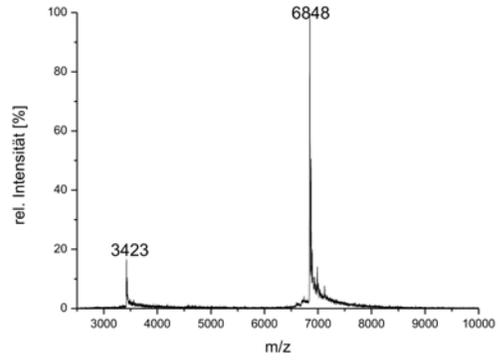
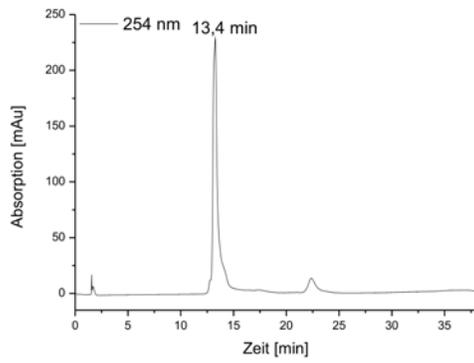
7.3: Cys-Oligonukleotid F2



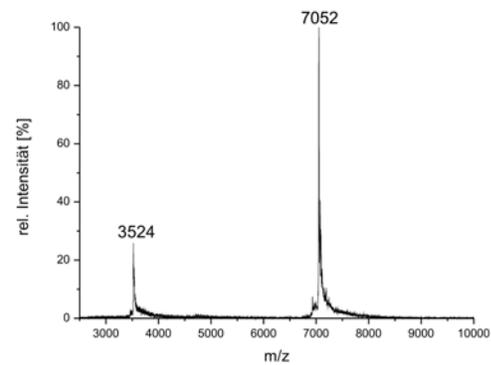
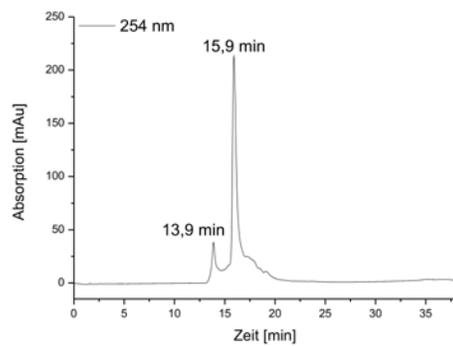
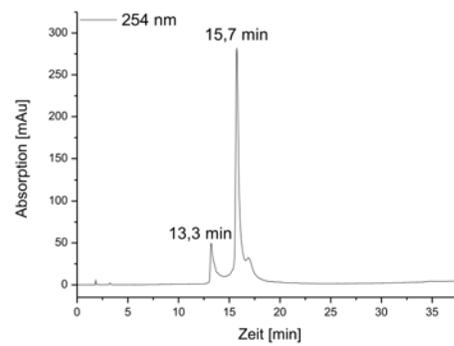
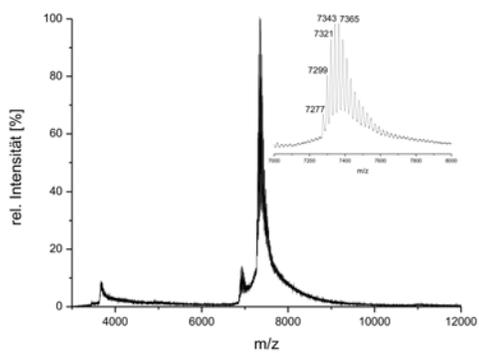
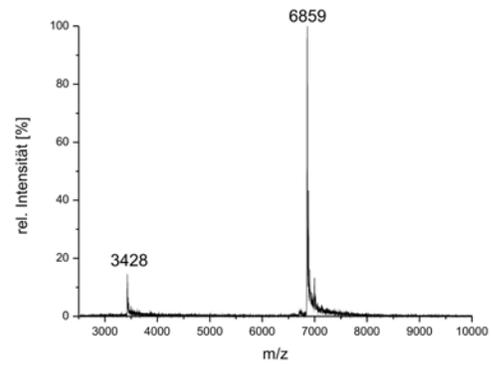
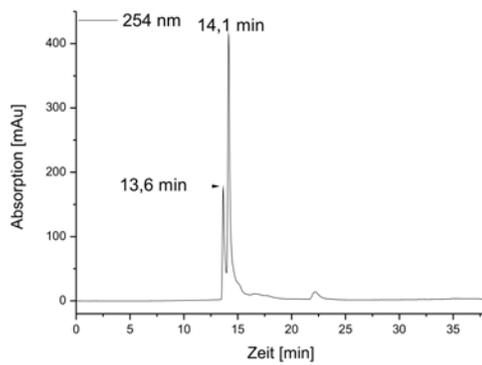
7.4: Cys-Oligonukleotid F3



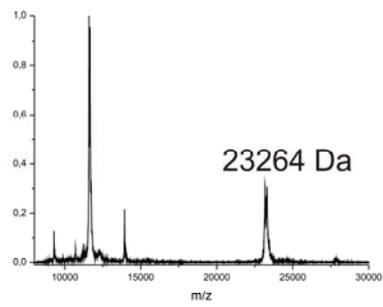
7.5: Cys-Oligonukleotid F4



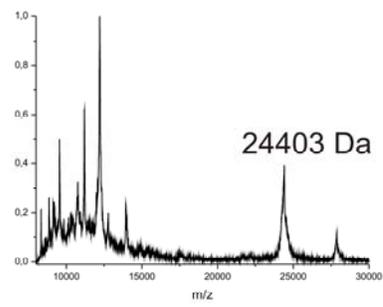
7.6: Cys-Oligonukleotid F6



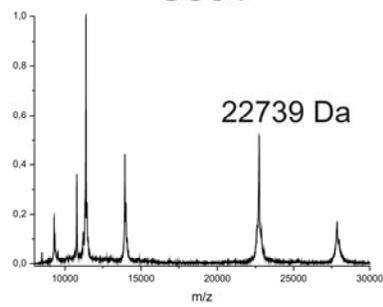
7.7: Maldi-Spektren der Ypt-Proteine



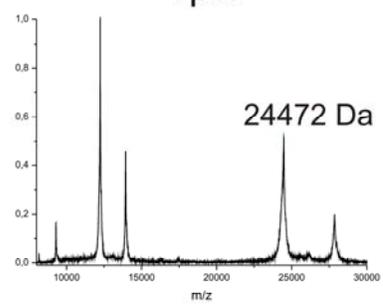
Sec4



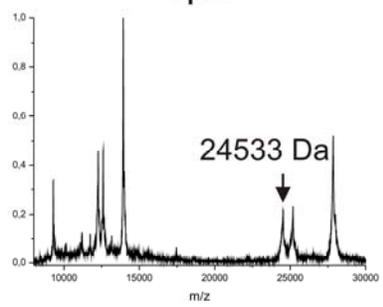
Ypt6



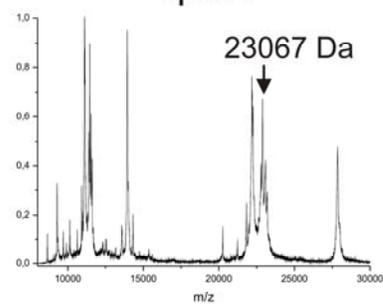
Ypt7



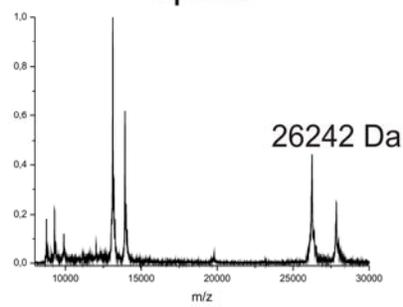
Ypt31



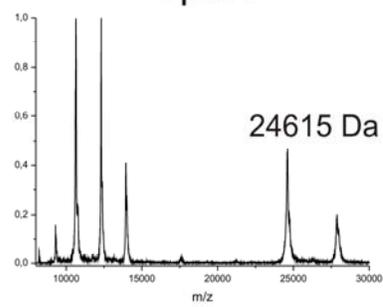
Ypt32



Ypt51



Ypt52



Ypt53

7. Anhang

7.9: Tabelle 7.1: Reaktionsbedingungen zur Ligation von Biotin-TMPK1-30 mit TMPK31-212*

	Mesna/ mM	MPAA/ eq.	Thiophenol/ % (v/v)	EtSH/ % (v/v)	pH	T/ °C	Ausbeute
1	250	-	-	4	7,2	RT	20 %
2	250	-	-	4	7,5	RT	20 %
3	250	-	-	4	8,0	RT	20 %
4	250	-	-	4	8,2	RT	30 %
5	250	-	-	4	7,2	35°C	15 %
6	250	-	-	4	7,5	35°C	20 %
7	250	-	-	4	8,0	35°C	20 %
8	250	-	-	4	8,2	35°C	20 %
9	250	-	4	-	7,2	RT	20 %
10	250	-	4	-	7,5	RT	20 %
11	250	-	4	-	8,0	RT	20 %
12	250	-	4	-	8,2	RT	15 %
13	250	-	4	-	7,2	35°C	15 %
14	250	-	4	-	7,5	35°C	20 %
15	250	-	4	-	8,0	35°C	20 %
16	250	-	4	-	8,2	35°C	35 %
17	-	50	-	-	7,2	RT	20 %
18	-	50	-	-	7,5	RT	20 %
19	-	50	-	-	8,0	RT	15 %
20	-	50	-	-	8,2	RT	15 %
21	-	50	-	-	7,2	35°C	15 %
22	-	50	-	-	7,5	35°C	15 %
23	-	50	-	-	8,0	35°C	15 %
24	-	50	-	-	8,2	35°C	15 %
25	-	100	-	-	7,2	RT	50 %
26	-	100	-	-	7,5	RT	50 %
27	-	100	-	-	8,0	RT	30 %
28	-	100	-	-	8,2	RT	20 %
29	-	100	-	-	7,2	35°C	40 %
30	-	100	-	-	7,5	35°C	45 %
31	-	100	-	-	8,0	35°C	15 %
32	-	100	-	-	8,2	35°C	20 %
33	-	150	-	-	7,2	RT	50 %
34	-	200	-	-	7,2	RT	50 %

*Bei allen Ansätzen wurde die Konzentration konstant auf 66 μ M gehalten und die Reaktionsdauer betrug 12 h.

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Christian Becker für die interessante Themenstellung, die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Bei Prof. Dr. Roger S. Goody bedanke ich mich für die Aufnahme in seine Abteilung zu Beginn der Promotion.

Ferner danke ich Prof. Dr. _____ für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. Ralf Seidel danke ich für viele hilfreiche Diskussionen und experimentelle Ratschläge. Außerdem dafür, dass er uns tagtäglich gezeigt hat, dass wir ganz kleine Lichtlein sind und noch ein sehr langer Weg vor uns liegt.

Dr. Hendrik Schroeder und Prof. Dr. Niemeyer danke ich für die Bereitstellung der DNA-Mikroarrays und für die Einführung in die Mikroarray-Technologie.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Goody und Dr. Itzen für die Bereitstellung der Ypt-Expressionsvektoren und die Expression des DSS4.

Herrn Cordes und Herrn Krause danke ich für die Unterstützung bei der Aufnahme der Massenspektren.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung 3 des MPI für molekulare Physiologie, für die gute Arbeitsatmosphäre, besonders aber Sascha, Kester, Jörg, Uyen, Miria und Diana für zahlreiche Diskussionen, Unterstützung in jeder Hinsicht und die gemütlichen abendlichen Bierproben. Außerdem sei Lin, Sunanda, Marc und Horst-Günther für die gute Arbeitsatmosphäre gedankt. Für technische Hilfestellung danke ich Anke, Karin, Nina und Martina.

Noch einmal hervorgehoben sei der Dank an Diana Olschewski, welche stete Hilfe angeboten und geleistet hat.

Mein Großer Dank geht an meine Münchner Kollegen, welche mich auf der letzten Etappe meiner Doktorarbeit begleitet haben, für ordentliche, saubere Labors und eine gute Arbeitsatmosphäre. Im Besonderen Karine, Firouzeh, Johannes, dem Wörndl, Waldemar für seine abstrusen Theorien, Nam dafür, dass er jeden Abend das Labor abgeschlossen hat und Caro, dass sie meine Abneigung gegen die Farbe Rosa, gegen Katzen im allgemeinen und *Hello Kitty* im speziellen, genährt hat. Und natürlich dem Safety-Brehs für seine schlechten Witze, die Einführung in neue Technologien, wie der Benutzung des Internets, und dem erhobenen Zeigefinger: „*Gleich getan ist Zeit gespart.*“

Katja sei gedankt für die Aufrechterhaltung des Laborbetriebs und zahlreiche Tipps, um sich im Alltag zu behaupten.

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich bei meiner Ausbildung in jeder Hinsicht unterstützt haben und allen Freunden, die den Lebensweg begleiten.

Zuletzt sei Swetlana gedankt für die Durchsicht dieser Arbeit und eine schöne Zeit.

Lebenslauf

Name	Lars Gogolin
Geburtsdatum/-ort	25.08.1979 Dortmund
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
08 Juni 1998	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife am Geschwister Scholl Gymnasium in Unna
07/1998 – 04/1999	Wehrdienst
04/1999 – 08/2005	Studium der Chemie an der Universität Dortmund
08/2005 – 05/2006	Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel „Synthese von Protein-DNA-Konjugaten zur Herstellung eines Protein-Micro-Arrays“ am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund
06/2006 – 11/2007	Beginn der Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund unter der Betreuung von Prof. Dr. Christian F. W. Becker
12/2007	Umzug der Arbeitsgruppe zur Technischen Universität München, Garching

Publikationen

- Thimmaiah Govindaraju, Pascal Jonkheijm, Lars Gogolin, Hendrik Schroeder, Christian F. W. Becker, Christof M. Niemeyer, and Herbert Waldmann (2008). Surface Immobilization of Biomolecules by Click Sulfonamide Reaction. *Chem. Commun.*, 3723–3725.
- Lars Gogolin, Ralf Seidel, Martin Engelhard, Roger S. Goody, Christian F. W. Becker (2010). Semisynthesis of Human Thymidin Monophosphate Kinase. *PeptideScience*, **94** (4), 433-440.

Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Garching, August 2010

Lars Gogolin