

Proteinmodifikationen

DOI: 10.1002/ange.200600570

Ligation eines synthetischen Peptids an den N-Terminus eines rekombinanten Proteins durch semisynthetisches *trans*-Proteinspleißen***Christina Ludwig, Martina Pfeiff, Uwe Linne und Henning D. Mootz**

Die Erzeugung von chemisch modifizierten Proteinen mit definierter kovalenter Struktur trägt wesentlich zum Studium von Proteinfunktionen auf molekularer Ebene bei. Einzigartige biochemische, biophysikalische oder sogar auf lebenden Zellen basierende Studien werden durch die exakte Einführung z.B. von Fluorophoren, biophysikalischen Sonden, nichtnatürlichen Aminosäuren mit veränderten Seitenketten und Rückgrat-Kompositionen oder posttranslationalen Modifikationen möglich.^[1] Es wurden bereits verschiedene Techniken genutzt, um solche synthetischen Gruppen spezifisch in Proteine einzubauen.^[2] Die zurzeit wohl am häufigsten verwendete Methode ist die native chemische Ligation (NCL).^[2b] NCL basiert auf der chemoselektiven Ligation zweier Polypeptide (die entweder synthetisch oder rekombinant generiert wurden), von denen eines eine C-terminale α -Thioesterfunktion und das andere einen N-terminalen Cysteinrest enthält. Das Ligationsprodukt einer solchen Reaktion liefert je nach verwendeten Reaktanten entweder ein komplett synthetisches oder ein am N- bzw. C-Terminus modifiziertes semisynthetisches Protein (Übersicht siehe Lit. [3]).

Allerdings können die für eine erfolgreiche NCL benötigten Reaktionsbedingungen sowie die Einführung der beiden essenziellen funktionellen Gruppen in die Reaktanten problematisch sein und so die Anwendbarkeit und die praktische Durchführung dieser Methode einschränken. Durch die bimolekulare Natur der Ligation werden hohe Reaktantenkonzentrationen benötigt, um gute Ausbeuten zu erzielen. Die Erzeugung von Proteinen oder Peptiden mit einem C-terminalen α -Thioester kann technische Schwierigkeiten mit sich bringen. Rekombinante Proteine mit α -Thioestergruppen werden durch die Fusion des Zielproteins mit einem modifizierten Intein und durch die anschließende Thiolysen

des Konstruktes generiert.^[2c,f] Chemoenzymatische Ansätze zur Herstellung semisynthetischer Proteine umfassen die reverse Proteolyse,^[2a,h,i,4] die ebenfalls die Synthese eines Peptids mit aktiver Esterfunktion voraussetzt, oder den erst kürzlich beschriebenen Gebrauch des Enzyms Sortase.^[2k] Wir zeigen hier, dass das *trans*-Proteinspleißen zur Herstellung von N-terminal modifizierten semisynthetischen Proteinen genutzt werden kann. Die Vorteile unseres Ansatzes liegen darin, dass weder eine α -Thioestergruppe am synthetischen Peptid noch hohe Reaktantenkonzentrationen benötigt werden.

Das Proteinspleißen beschreibt ein autokatalytisches Herausschneiden einer internen Proteindomäne, des Inteins, aus einem Vorläuferprotein, wobei gleichzeitig die flankierenden Sequenzen, die N- und C-Exteine, durch eine native Peptidbindung miteinander verbunden werden.^[5] Beim *trans*-Proteinspleißen ist die Inteindomäne in zwei Hälften geteilt: Int^N und Int^C. Beide Hälften müssen zunächst einen Komplex bilden, um sich dann in die aktive Form des Inteins zu falten.^[6]

Unser Ansatz bestand darin, das zu modifizierende Protein rekombinant als C-Extein in Fusion mit einem Int^C-Fragment herzustellen, während ein Polypeptid, bestehend aus dem N-Extein mit der gewünschten Modifikation und dem Int^N-Fragment, durch Festphasensynthese generiert werden sollte (siehe Abbildung 1A). Eine Spleißreaktion dieser beiden Reaktanten würde das gewünschte N-terminal modifizierte semisynthetische Zielprotein liefern. Allerdings liegen die typischen Größen von gespaltenen Inteinfragmenten bei 100–180 Aminosäuren für Int^N und bei 36–50 Aminosäuren für Int^C, sodass bisher nur letzteres Fragment durch Festphasensynthese zugänglich war.^[7] Eine kürzliche genetische Studie von alternativen Spaltpositionen im *Ssp*-DnaB-Intein ergab jedoch, dass ein Int^N-Fragment aus lediglich 11 Aminosäuren und sein aus 143 Aminosäuren bestehendes Gegenstück Int^C aktiv im *trans*-Proteinspleißen waren, wenn beide Hälften in *E. coli* co-exprimiert wurden.^[8]

Die Schlüsselfrage zu Beginn unserer Untersuchungen war deshalb, ob das Intein auch *in vitro* aus den beiden Fragmenten rekonstituiert werden könnte. Dies war durchaus fragwürdig, da die 11 Aminosäuren des Int^N-Fragments zwei kurze β -Faltblatt-Strukturen bilden, die einen Teil der aktiven Tasche des Inteins ausmachen.^[9] Somit sollte die Faltung des aus den Aminosäuren 12–154 bestehenden Int^C-Fragments in die kompakte und der nativen Form ähnliche Struktur gehindert sein. Während sowohl die Gegenwart von endogenen Chaperonen als auch die Co-Expression der komplementären Fragmente zu einer korrekten Faltung *in vivo* beigetragen haben könnten, wäre bei den isolierten Fragmenten eine größere Wahrscheinlichkeit zur Missfaltung und Aggregation zu erwarten, wie es bereits für verschiedene gespaltene Proteine und Inteine beobachtet wurde.^[10]

Daher haben wir in einem ersten Modellversuch die Intein-Fusionsproteine Trx-Int^N (**1**) und Int^C-His₆ (**2**) generiert, die als N-Extein Thioredoxin (Trx) und als C-Extein eine kurze Polypeptidsequenz mit einem Hexahistidin-Tag (His₆) enthielten (Abbildung 1B). Nach der separaten Expression von **1** und **2** in *E. coli* konnten beide Proteine aus den löslichen Fraktionen gereinigt werden, was zumindest eine partielle Faltung des Int^C-Fragments wahrscheinlich erscheint.

[*] C. Ludwig, M. Pfeiff, Dr. U. Linne, Dr. H. D. Mootz
Philipps-Universität Marburg
Fachbereich Chemie/Biochemie
Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg (Deutschland)
Fax: (+49) 6421-282-2191
E-Mail: mootz@chemie.uni-marburg.de

[**] Wir danken Prof. Mohamed Marahiel für seine stetige Unterstützung. Unsere Arbeiten werden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Emmy Noether-Stipendium) und den Fonds der Chemischen Industrie finanziell gefördert. C.L. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Promotionsstipendium.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

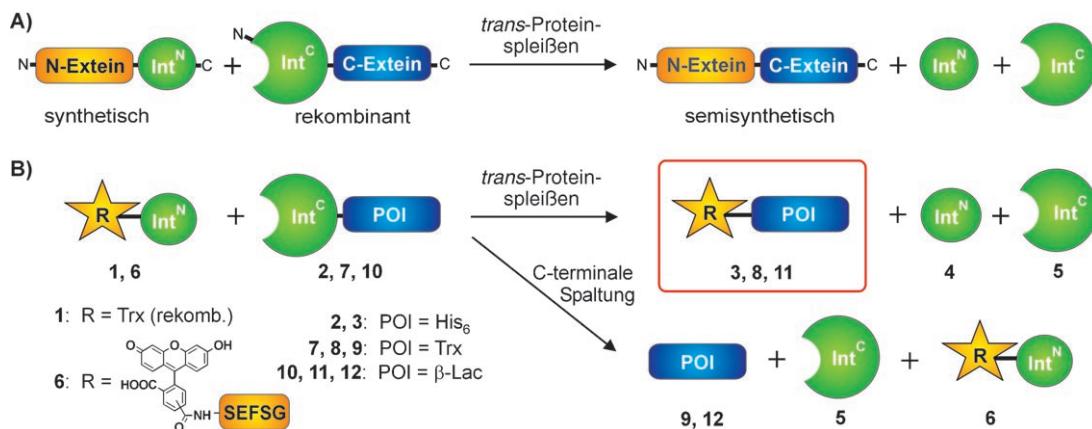


Abbildung 1. Prinzip unserer Spleißmethode: A) Durch N- und C-terminale Inteinfragmente (Int^N und Int^C) vermitteltes *trans*-Proteinspleißen führt zur Ligation der beiden Exteinsequenzen durch eine native Peptidbindung. B) Die Gruppe R, die das N-Extein repräsentiert und chemische Modifikationen enthalten kann, wurde an den N-Terminus des zu modifizierenden Proteins ligiert (POI = „protein of interest“). Das Int^N -Fusionskonstrukt kann entweder ein synthetisches Peptid oder ein rekombinanter Protein sein. Die C-terminale Spaltungsreaktion ist eine frühzeitige Freisetzung des zu modifizierenden Proteins vom Int^C -Fragment und trat als Nebenreaktion auf. Die berechneten molekularen Massen (in Da) sind: 1: 14 798.9, 2: 18 078.5, 3: 15 035.0, 4: 13 20.5, 5: 16 539.0, 6: 2186.1, 7: 30 212.6, 8: 14 556.1, 9: 13 690.0, 10: 47 252.9, 11: 31 596.7, 12: 30 731.0. βLac = β -Lactamase, His₆ = Hexahistidin-Tag, Trx = Thioredoxin.

nen ließ. Inkubation von **1** und **2** in äquimolaren Mengen (je 12 μM) bei pH 7.0 und 25°C führte tatsächlich zum erwarteten Spleißprodukt, das mit SDS-PAGE und ESI-TOF-MS nachgewiesen wurde (siehe Hintergrundinformationen). Eine kinetische Untersuchung der Reaktion zeigte, dass eine Spleißausbeute von ca. 25% nach 40 h Inkubation erreicht werden konnte. Dieses Ergebnis machte zum einen eine erstaunliche Robustheit der Inteinfragmente Int^N und Int^C deutlich, zum anderen lieferte es den Beweis, dass die Rekonstitution der rekombinanten Fragmente zum aktiven Intein auch *in vitro* ohne die Notwendigkeit weiterer Renaturierungsschritte stattfinden kann.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen ersetzen wir im nächsten Schritt das rekombinante Konstrukt **1** durch das synthetische Peptid 5(6)-Carboxyfluorescein-SEFSGCIS-GDSLISLASR (Konstrukt **6**, Abbildung 1B, die Sequenz von Int^N ist unterstrichen). 5(6)-Carboxyfluorescein-SEFSG (abgekürzt Fl) repräsentiert das N-Extein, wobei die beiden kursiv dargestellten Aminosäuren den nativen flankierenden Resten des Inteins entsprechen. Die beiden C-terminalen Aminosäuren wurden dem Peptid in Analogie zur Sequenz von **1** zugefügt. Nach der Inkubation von **6** und Int^C -His₆ (**2**) konnte erneut die spontane Bildung des aktiven Inteins beobachtet werden. Das semisynthetische Spleißprodukt Fl-SIEGSRSHHHHH wurde unter UV-Licht auf einem 20-proz. Acrylamid-SDS-PAGE-Gel und mit ESI-TOF-MS detektiert (Daten nicht gezeigt; $M_{\text{per.}} = 2423.3$, $M_{\text{exp.}} = 2423.8$ Da). In allen Int^C -Konstrukten sind drei native Aminosäuren im C-Extein übernommen worden (kursiv dargestellt).

Um das Potenzial unserer Methode zur Semisynthese von Proteinen zu testen, wurden im nächsten Schritt größere Proteine als C-Exteine eingesetzt. Das Konstrukt Int^C -Trx-His₆ (**7**), in welchem das 12 kDa große Protein Trx das C-Extein repräsentiert (Abbildung 1B), wurde in *E. coli* exprimiert und aus der löslichen Fraktion gereinigt. Nach der

Reaktion von **7** mit dem synthetischen Peptid **6** konnten sowohl das gewünschte semisynthetische Protein Fl-Trx-His₆ (**8**) als auch die beiden anderen Produkte der Spleißreaktion, Int^N (**4**) und Int^C (**5**), identifiziert werden (Abbildung 2A–C).

Eine generelle Annahme beim *trans*-Proteinspleißen ist, dass die Komplexbildung der Inteinfragmente sehr schnell abläuft, während die folgende pseudo-monomolekulare Reaktion des Intefaltens und Proteinspleißens geschwindigkeitsbestimmend ist.^[11] In Übereinkunft mit diesem Modell konnten die kinetischen Daten der Spleißreaktionen von **6** und **7** mit einer Kinetik erster Ordnung angeglichen werden. Die ermittelte Geschwindigkeitskonstante von $k = (4.1 \pm 0.2) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ liegt in der gleichen Größenordnung wie die des nativ gespaltenen *Ssp*-DnaE-Inteins,^[11] ist allerdings um das 17fache kleiner als die Geschwindigkeitskonstante für das artifiziell erzeugte *Ssp*-DnaB-Intein, das an der bereits als tolerant bekannten Insertionsposition der Endonuklease gespalten wurde.^[12] Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Spaltposition, die in unserer Studie verwendet wurde, die Assoziation und Faltung der Inteinfragmente ungünstig beeinflusst. Neben diesen kinetischen Unterschieden ist aber die erzielte Ausbeute an Spleißprodukt mit Werten zwischen 40 und 45% für beide Spaltpositionen identisch^[12] und liegt im Rahmen dessen, was für andere gespaltene Inteine beschrieben wurde.^[7a, 10c, 11–14]

Interessanterweise wurden weitere 40 bis 45% des Reaktanten Int^C -Trx-His₆ (**7**) in das zusätzliche Produkt **9** umgesetzt, das durch ESI-TOF-MS als das C-Extein Trx-His₆ identifiziert wurde (Abbildung 2A, C). Die Bildung von **9** ließ sich als Reaktion erster Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k = (2.1 \pm 0.9) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ausdrücken (Abbildung 2D). Zwar ist diese C-terminale Spaltung eine unerwünschte Nebenreaktion, sie ist aber nicht problematisch, solange es gelingt, Spleißprodukt und Spaltungsprodukt in einem anschließenden Reinigungsschritt voneinander zu trennen.^[15]

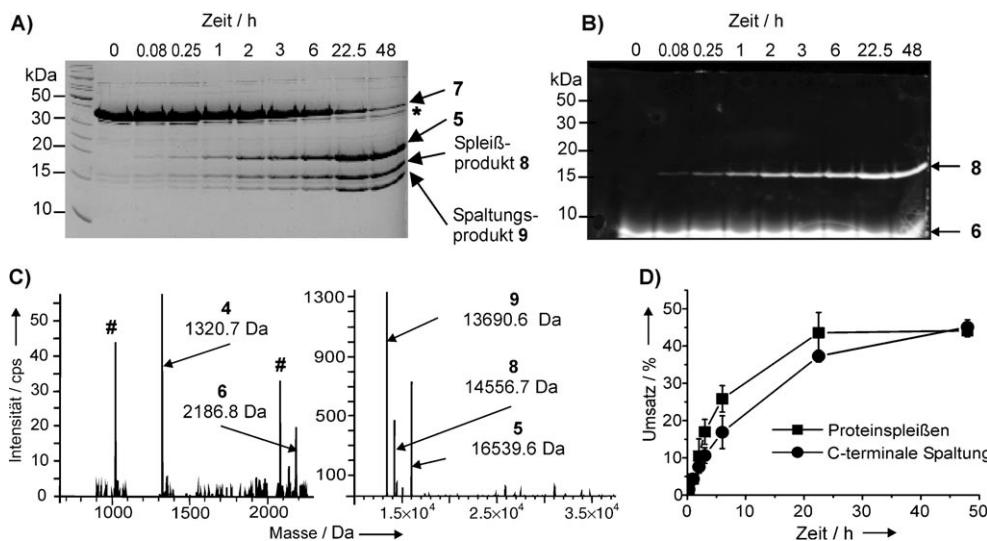


Abbildung 2. Semisynthetisches *trans*-Proteinspleißen. Analyse der Reaktion des synthetischen Peptids **6** ($80 \mu\text{M}$) mit dem rekombinanten Protein Int^C-Trx-His₆ (**7**) ($40 \mu\text{M}$) bei 25°C zum semisynthetischen Spleißprodukt Fl-Trx-His₆ (**8**). A, B) Reaktionsfortschritt, verfolgt mit SDS-PAGE und Coomassie-Anfärbung (A) oder unter UV-Licht (B) (* = Verunreinigung). C) ESI-TOF-MS des Reaktionsgemisches nach 48 h Inkubation (# = Massensignal einer Verunreinigung). D) Zeitabhängigkeit der Proteinspleißreaktion und der C-terminalen Spaltung.

Weiterhin stellten wir fest, dass ein molarer Überschuss an synthetischem Peptid **6** gegenüber Protein **7** die Produktausbeute nicht erhöht (Daten nicht gezeigt). Die besten Ergebnisse wurden vielmehr bei einem Molverhältnis von 1:1 erzielt, was unter Kostenaspekten vorteilhaft ist, da nur relativ kleine Mengen des synthetischen Peptids verbraucht werden. In Kontrollreaktionen mit Inteinfragmenten, bei denen für die Katalyse essenzielle Aminosäuren mutiert waren, konnten wir bestätigen, dass die Reaktion gemäß dem etablierten Mechanismus des Proteinspleißens ablief (siehe Hintergrundinformationen).

Um die Praxistauglichkeit unserer Methode zu demonstrieren, wurden Synthese, Reinigung und biochemische Charakterisierung zweier Fluorescein-markierter Proteine im größeren Maßstab durchgeführt. Zur Semisynthese von Fl-Trx-His₆ (**8**) wurden die bereits erwähnten Reaktanten **6** und **7** in äquimolaren Konzentrationen von je $62 \mu\text{M}$ und in einem Reaktionsvolumen von 1.5 mL gemischt (entspricht 0.2 mg Peptid und 2.8 mg Protein). Nach 22 h Inkubation bei 25°C waren ca. 40% von **7** in das gewünschte Produkt **8** umgesetzt. Reines Fl-Trx-His₆ (**8**) wurde durch Anionenaustausch- und Ni-NTA-Chromatographie in einer Gesamtausbeute von 30% ($\approx 0.4 \text{ mg}$) erhalten (Abbildung 3 A–C). In Abbildung 3 D ist gezeigt, dass **8** in einem Insulin-Präzipitations-Test^[16] eine etwas höhere Aktivität als ein rekombinant generiertes Thioredoxin (**1**) als Positivkontrolle aufwies.

Als zweites Beispiel diente die β -Lactamase (β Lac) mit einem Molekulargewicht von 30.7 kDa . Das Fusionsprotein Int^C- β Lac-His₆ (**10**, Abbildung 1 B) befand sich nach der Expression in *E. coli* in der unlöslichen Fraktion, konnte allerdings nach der Aufnahme in 8 M Harnstoff durch Ni-NTA-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden. Lösliches Protein wurde durch Rückfaltung nach einem Dialyseschritt erhalten. Durch Inkubation von

Peptid **6** mit Protein **10** bei 25°C (Konzentration jeweils $12 \mu\text{M}$, $\approx 1.7 \text{ mg}$ Protein **10**) für 42 h entstand das Spleißprodukt Fl- β Lac-His₆ (**11**) mit einem Umsatz von 35% . Das C-terminale Spaltungsprodukt **12** trat auch hier wieder in ähnlichen Mengen auf (Abbildung 4 A, B). Nach Anionenaustausch- und Ni-NTA-Chromatographie wurde Produkt **11** in guter Reinheit und mit einer Gesamtausbeute von 30% ($\approx 0.3 \text{ mg}$) erhalten (Abbildung 4 C).

Die Enzymaktivität dieses semisynthetischen Proteins wurde photometrisch durch die Hydrolyse von Nitrocefin bestimmt (Abbildung 4 D). Dabei konnte kein Unterschied

zwischen dem Spleißprodukt **11** und einer unabhängig präparierten rekombinanten Positivkontrolle, β Lac-His₆, festgestellt werden ($K_{\text{M(Fl-}\beta\text{Lac)}} = (119.7 \pm 4.2) \mu\text{M}$, $K_{\text{M(}\beta\text{Lac)}} = (112.7 \pm 3.3) \mu\text{M}$, $k_{\text{kat(Fl-}\beta\text{Lac)}} = (212 \pm 30) \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{kat(}\beta\text{Lac)}} = (204 \pm 42) \text{ s}^{-1}$).

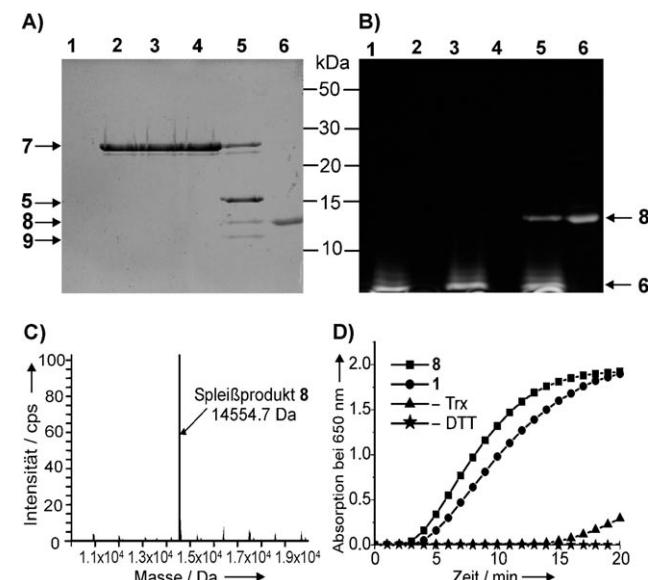


Abbildung 3. Präparation und Charakterisierung des semisynthetischen Fl-Trx-His₆ (**8**). A, B) Reaktion und Reinigung, verfolgt mit SDS-PAGE und Coomassie-Anfärbung (A) oder unter UV-Licht (B). Spur 1: Peptid **6**; Spur 2: Protein **7**; Spur 3: Reaktion von **6** und **7** bei $t = 0 \text{ h}$; Spur 4: Protein **7** alleine unter den gleichen Bedingungen nach 22 h Inkubation; Spur 5: wie in Spur 3, aber $t = 22 \text{ h}$; Spur 6: gereinigtes semisynthetisches Produkt **8**. C) ESI-TOF-MS des gereinigten Produktes **8**. D) Enzymaktivitätstest von **8** durch Insulin-Präzipitation im Vergleich zu einem Trx-Kontrollkonstrukt (**1**). In zwei Negativkontrollen wurden entweder das Trx-Enzym oder das Substrat DTT dem Reaktionsgemisch nicht zugefügt.

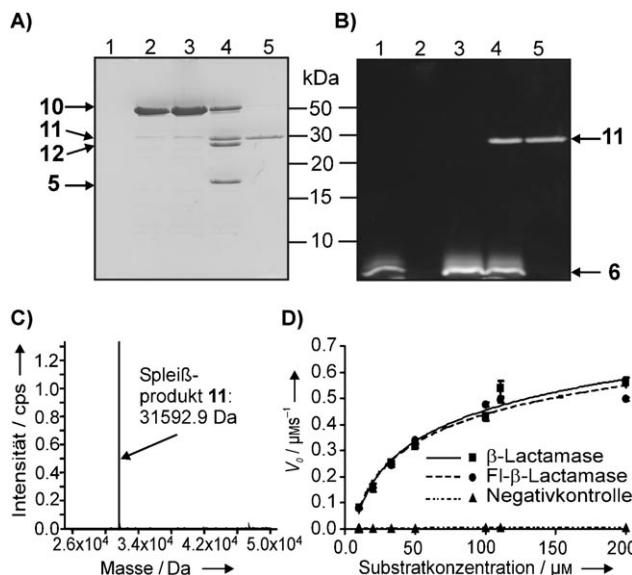


Abbildung 4. Präparation und Charakterisierung des semisynthetischen Fl- β Lac-His₆ (11). A, B) Analyse der Reaktion und Reinigung mithilfe eines SDS-PAGE-Gels und einer Coomassie-Anfärbung (A) oder unter UV-Licht (B). Spur 1: Peptid 6; Spur 2: Protein 10; Spur 3: 6 und 10 mit jeweils 12 μ M und $t=0$ h; Spur 4: Reaktion von 6 und 10 bei 25 °C und $t=42$ h; Spur 5: gereinigtes semisynthetisches Fl- β Lac-His₆ (11). C) ESI-TOF-MS von reinem 11 ($M_{ber.}=31596.7$ Da). D) Enzymaktivitätstest von 11 basierend auf der Hydrolyse von Nitrocefin. Als eine Positivkontrolle diente das Konstrukt β -Lactamase-His₆, als Negativkontrolle wurde das Konstrukt 7 genutzt.

Somit konnten zwei semisynthetische Proteine in guter Reinheit und Ausbeute erhalten werden. Ihre enzymatische Aktivität war durch die Expression als Inteinfusion und die folgende Reaktion des Proteinspleißens nicht beeinträchtigt.

Zusammenfassend wurde eine leicht anzuwendende Methode basierend auf *trans*-Proteinspleiß zur Herstellung von N-terminal modifizierten Proteinen entwickelt. Einer der Hauptvorteile gegenüber der nativen chemischen Ligation besteht darin, dass keine Synthese von Peptiden mit α -Thioestern oder anderen aktiven Estergruppen nötig ist. Auch die Erzeugung von N-terminalen Cysteingruppen an rekombinanten Proteinen, z.B. durch Behandlung mit einer Protease, die wiederum einen Reinigungsschritt mit sich bringt, ist nicht erforderlich. Effiziente Umsetzungen werden aufgrund der Affinität der Inteinhalbteile bereits bei niedrigen Reaktantkonzentrationen im Bereich von 10 bis 60 μ M erreicht. Die Aminosäure, die nach der Spleißreaktion an der Verknüpfungsstelle im Produkt enthalten bleibt, ist im Fall des *Ssp*-DnaB-Inteins ein Serin, das in der Regel besser toleriert werden sollte als der Cysteinrest, der bei einer nativen chemischen Ligation vorhanden sein muss. Unser Ansatz hat das Potenzial, allgemein anwendbar zu sein, da Inteine vielfältige Exteinsequenzen tolerieren.

Eingegangen am 12. Februar 2006
Online veröffentlicht am 5. Juli 2006

Stichwörter: Inteine · Peptide · Proteinmodifikationen · Proteinspleiß · Semisynthesen

- [1] a) M. E. Hahn, T. W. Muir, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 26; b) L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 34; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34.
- [2] a) D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, *266*, 243; b) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776; c) H. F. Gaertner, R. E. Offord, R. Cotton, D. Timms, R. Camble, K. Rose, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 7224; d) D. A. Erlanson, M. Chyttil, G. L. Verdine, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 981; e) T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705; f) T. C. Evans, Jr., J. Benner, M. Q. Xu, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2256; g) L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, *292*, 498; h) N. Wehofsky, N. Koglin, S. Thust, F. Bordusa, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6126; i) Z. Machova, R. von Eggelkraut-Gottanka, N. Wehofsky, F. Bordusa, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5065; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4916; j) B. L. Nilsson, R. J. Hondal, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5268; k) H. Mao, S. A. Hart, A. Schink, B. A. Pollok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2670.
- [3] a) P. E. Dawson, S. B. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923; b) T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249; c) B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 91.
- [4] T. K. Chang, D. Y. Jackson, J. P. Burnier, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 12544.
- [5] C. J. Noren, J. Wang, F. B. Perler, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 458; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 450.
- [6] a) H. Wu, Z. Hu, X. Q. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9226; b) H. Paulus, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 447.
- [7] a) B. M. Lew, K. V. Mills, H. Paulus, *Biopolymers* **1999**, *51*, 355; b) T. C. Evans, Jr., D. Martin, R. Kolly, D. Panne, L. Sun, I. Ghosh, L. Chen, J. Benner, X. Q. Liu, M. Q. Xu, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9091; c) I. Giri, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7180.
- [8] W. Sun, J. Yang, X. Q. Liu, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35281.
- [9] Y. Ding, M. Q. Xu, I. Ghosh, X. Chen, S. Ferrandon, G. Lesage, Z. Rao, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 39133.
- [10] a) K. V. Mills, B. M. Lew, S. Jiang, H. Paulus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 3543; b) K. Shingledecker, S. Q. Jiang, H. Paulus, *Gene* **1998**, *207*, 187; c) M. W. Southworth, E. Adam, D. Panne, R. Byer, R. Kautz, F. B. Perler, *EMBO J.* **1998**, *17*, 918; d) T. Yamazaki, T. Otomo, N. Oda, Y. Kyogoku, K. Uegaki, N. Ito, Y. Ishino, H. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5591; e) H. Yagi, T. Tsujimoto, T. Yamazaki, M. Yoshida, H. Akutsu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16632.
- [11] D. D. Martin, M. Q. Xu, T. C. Evans, Jr., *Biochemistry* **2001**, *40*, 1393.
- [12] S. Brenzel, T. Kurpiers, H. D. Mootz, *Biochemistry* **2006**, *45*, 1571.
- [13] H. D. Mootz, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9044.
- [14] Die restliche Fraktion verbleibt aus bislang unbekannten Gründen im Reaktionsgemisch vorhanden, ohne zu reagieren. Missfaltung und Aggregation sind die wahrscheinlichsten Erklärungen für dieses Phänomen.
- [15] Wir nehmen an, dass die beobachtete C-terminale Spaltung eine unvollständige Faltung des Inteins unter In-vitro-Bedingungen widerspiegelt, da während der Coexpression von **1** und **7** in *E. coli* ausschließlich die Bildung des Spleißproduktes nachgewiesen werden konnte. Die C-terminale Spaltung wurde dagegen mit den gleichen, aber zuvor gereinigten Konstrukten bei einer In-vitro-Reaktion beobachtet (Hintergrundinformationen und nicht gezeigte Daten). Dies schließt mögliche Störungen der Spleißreaktion aufgrund von Exteinsequenzen als Ursache für

die C-terminale Spaltung aus. Mehrere Versuche, die unerwünschte Spaltung durch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen zu unterdrücken, z.B. durch Ändern der Temperatur, Salzkonzentration im Puffer, Art des reduzierenden Additivs im Puffer und pH-Wert (Hintergrundinformationen), waren bislang

erfolglos. Dennoch konnten wir mit unseren Ergebnissen zeigen, dass der Int^N-Int^C-Komplex nahezu quantitativ gebildet wird. Dies sollte eine gute Ausgangsposition für zukünftige Optimierungen sein, um eine quantitative Bildung des Spleißproduktes zu erreichen.

- [16] A. Holmgren, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 9627.
-