



universität  
wien

# MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

Chemische Synthese eines SemiSWEET-Transporters

verfasst von / submitted by

Franziska Albler, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
Master of Science (MSc)

Wien, 2020 / Vienna 2020

Studienkennzahl lt. Studienblatt / degree  
programme code as it appears on  
the student record sheet:

UA 066 862

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Masterstudium Chemie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Christian Friedrich Wilhelm Becker



# Inhaltsverzeichnis

1. Abbildungsverzeichnis .....	6
2. Zusammenfassung.....	9
3. Abstract .....	10
4. Abkürzungsverzeichnis .....	11
5. Einleitung.....	15
5.1 Membranproteine und deren Bedeutung.....	15
5.1.1 Zuckertransporter.....	16
5.1.1.2 Unterschied SWEETs & SemiSWEETs .....	16
5.1.1.3 Fokus: Bakterielle Zuckertransporter, SemiSWEET's .....	17
5.2 Synthesemethoden von Membranproteinen.....	18
5.3 Warum Synthese statt Expression?.....	24
5.4 Ziel dieser Masterarbeit .....	25
6. Materialien, Methoden und Synthesen .....	27
6.1 Materialien .....	27
6.1.1 Instrumente.....	27
6.1.2 Chemikalien .....	28
6.1.2.1 Aminosäuren .....	28
6.1.2.2 Resins.....	29
6.1.2.3 Lösungsmittel .....	29
6.1.2.4 Reagenzien .....	29
6.1.2.5 Pufferlösungen .....	29
6.2 Methoden.....	29
6.2.1 Analytische Methoden .....	29
6.2.1.1 Varian (HPLC).....	29
6.2.1.2 Waters (LCMS).....	30
6.2.1.3 Charly (HPLC / RP-HPLC).....	30

6.2.2 Chemische Methoden .....	30
6.2.2.1 FPPS von Peptiden.....	30
6.2.2.2 Entschützung und Abspaltung der Peptide .....	31
6.2.2.3 Aufreinigung der Peptide .....	32
6.2.2.4 Native chemische Ligation der Peptide .....	32
7. Ergebnisse.....	33
7.1 Sequenz 1 (Seq. 1) .....	33
7.1.1 FPPS von Seq. 1 mittels Boc-Strategie.....	33
7.1.2 Reinigung von Seq. 1 .....	33
7.1.2.1 Problematik .....	36
7.1.2.2 Optimierung .....	39
7.1.3 Analyse von Seq. 1.....	40
7.2 Sequenz 2 (Seq. 2) .....	41
7.2.1 FPPS von Seq. 2 mittels Boc-Strategie.....	41
7.2.2 Reinigung von Seq. 2 .....	41
7.2.2.1 Problematik von Seq. 2.....	42
7.2.2.2 Optimierung .....	42
7.2.3 Analyse von Seq. 2.....	42
7.3 Sequenz 3 (Seq. 3) .....	43
7.3.1 FPPS von Seq. 3 mittels Boc-Strategie.....	43
7.3.2 Reinigung von Seq. 3 .....	43
7.3.2.1 Problematik .....	43
7.3.2.2 Optimierung .....	44
7.3.3 Analyse von Seq. 3.....	44
7.4. Löslichkeitsversuche der Seq. 1 - 3 und ihrer Rohpeptide .....	44
7.4.1 Problematik .....	46
7.4.2 Lösungsansätze.....	47
7.5 Kopplungsversuche mittels NCL.....	48

7.5.1 Analyse des Polypeptidstrangs nach Kopplung.....	49
7.5.2 Problematik und Lösungsansätze für die NCL.....	49
8. Zusammenfassung & Schlussfolgerung.....	51
9. Literaturverzeichnis.....	55
10. Danksagung.....	60

# 1. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Tabellarische Auflistung der 22 natürlichen Aminosäuren mit ihren dazugehörigen 3- und 1-Buchstabencode.....	13
<b>Abbildung 2</b> Tabellarische Auflistung der verwendeten Schutzgruppen mit den dazugehörigen Abkürzungen sowie ihrer chemischen Struktur.....	14
<b>Abbildung 3</b> Schematische Darstellung eines Integralmembranproteins, welches Kohlenhydrate durch die Doppelschicht der Membran transportiert.....	15
<b>Abbildung 4</b> Schematische Darstellung der A) SemiSWEET und B) SWEET Topologie. A) SemiSWEET aufgebaut aus einem tripelhelikalen Bündel (THB) in der Konformation 1 - 3 - 2. B) SWEET aufgebaut aus zwei THBs verknüpft über eine invertierte Linker-Helix.....	17
<b>Abbildung 5</b> Seitenansicht des Vibrio sp. SemiSWEET Protomers im Bändermodell mit, in unterschiedlichen Farben hervorgehobenen, TM1, TM3 und TM2 Helices, welche über Loops (Schleifen) verknüpft sind. (Yan Xu, Nov 2014).....	18
<b>Abbildung 6</b> Darstellung der Wechselwirkungen, wie die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, innerhalb der Resin-gebundenen Peptide, welche während der Peptidsynthese mittels LPPS sowie SPPS auftreten können und zur Aggregation des Peptides führen und stabilisieren. (C. Hyde, 1992) .....	19
<b>Abbildung 7b</b> Mechanismus der Nativen Chemischen Ligation (NCL) bis hin zur „Faltung“ des Polypeptids.....	21
<b>Abbildung 8</b> Mechanistische Darstellung von „Protein-Splicen“. (C. J. Norren, 2000).....	23
<b>Abbildung 9</b> Seitenansicht des zu synthetisierenden Membranproteins im Bändermodell, Vibrio sp. SemiSWEET Protomers und eine dazugehörige Seitenansicht im Längsschnitt (slab view) mit farblicher Markierung des elektrostatischen Potentials (rot = negativ, blau = positiv). (Yan Xu, Nov 2014).....	25
<b>Abbildung 10</b> Grafische Darstellung des Vibrio sp. Proteinstranges mit farblich gekennzeichneten Gliedern der zu synthetisierenden Peptidsequenzen <b>Seq. 1</b> (blau), <b>Seq. 2</b> (gelb) und <b>Seq. 3</b> (orange). .....	25
<b>Abbildung 11</b> Schematische Darstellung der drei zu synthetisierenden Peptidstränge mit ihren gekennzeichneten, für die nachfolgende NCL nötigen, Modifikationen.....	26
<b>Abbildung 12</b> Tabellarische Auflistung der verwendeten Instrumente.....	27
<b>Abbildung 13</b> Tabellarische Auflistung der verwendeten Aminosäuren.....	28
<b>Abbildung 14</b> Tabellarische Auflistung der verwendeten PAM-Harze als stationäre Phase für die Peptidsynthese.....	29
<b>Abbildung 15</b> Tabellarische Auflistung der verwendeten Lösungsmittel.....	29

<b>Abbildung 16</b> Tabellarische Auflistung der verwendeten Pufferlösungen mit ihrer Zusammensetzung. .....	29
<b>Abbildung 17:</b> Grafische Darstellung vom Proteinstrang mit farblich gekennzeichneten Gliedern der zu synthetisierenden Peptidsequenzen <b>Seq. 1</b> (blau), <b>Seq. 2</b> (gelb) und <b>Seq. 3</b> (orange) des gewünschten Membranproteins ( <b>Abbildung 13</b> ) mit den nötigen Modifikationen. ....	33
<b>Abbildung 18:</b> Grafische Darstellung der in blau hervorgehobenen 1. Sequenz ( <b>Seq. 1</b> ) der Peptidkette aus <b>Abbildung 13</b> , mit ihrer, für die NCL benötigten, Modifikation. ....	33
<b>Abbildung 19</b> HPLC-Chromatogramm zur präparativen Aufreinigung von <b>Seq. 1</b> an der Varian ( <b>6.1.1</b> ) innerhalb 30 min bei 50°C (3 ml/min) mit einem Gradienten von 5% - 65% Puffer B gegen Puffer A mit vorangegangenen 5 min entsalzen. ....	34
<b>Abbildung 20</b> HPLC-Chromatogramm an der Varian ( <b>6.1.1</b> ) innerhalb 30 min bei 50°C (3 ml/min) mit einem Gradienten von 5 - 95% Puffer B gegen Puffer A und vorangegangenen 10 min Entsalzen.....	35
<b>Abbildung 21</b> Absorbtionsspektrum des erneuten Aufreinigungsversuches von <b>Seq. 1</b> mit neuem, eigens geschriebenem, Reinigungsprogramm am Varian System ( <b>6.1.1</b> ).....	35
<b>Abbildung 22</b> Absorbtionsspektrum am Varian System ( <b>6.1.1</b> ) der ersten Negativkontrolle ( <b>NK1</b> )....	36
<b>Abbildung 23</b> Absorbtionsspektrum am Varian System ( <b>6.1.1</b> ) der zweiten Negativkontrolle ( <b>NK2</b> ). 36	
<b>Abbildung 24</b> Absorbtionsspektrum am Varian System ( <b>6.1.1</b> ) der dritten Negativkontrolle ( <b>NK3</b> ). Man beachte, dass hier eine wesentlich geringere Menge eingespritzt wurde, dementsprechend ist die Skalierung mal $10^{-2}$ , im Vergleich zu den Spektren in <b>Abbildung 22</b> und <b>23</b> , vom Programm angepasst worden. ....	37
<b>Abbildung 25</b> Chromatogramm am Varian System ( <b>6.1.1</b> ) von 8 Äquiv. Standard in ddH <sub>2</sub> O. Auch hier ist die neue Skalierung zu beachten.....	37
<b>Abbildung 26</b> Absorbtionsspektrum vom zweiten Standardlauf mit 4 Äquiv. Standard, jedoch mit vermutlich zu niedriger Lampenintensität. Skalierung ist dementsprechend auch zu beachten.....	38
<b>Abbildung 27</b> Absorbtionsspektrum vom ersten Wiederholungslauf mit 4 Äquiv. Standard. Skalierung ist dementsprechend auch zu beachten. ....	38
<b>Abbildung 28</b> Absorbtionsspektrum vom zweiten Wiederholungslauf mit 4 Äquiv. Standard. Skalierung ist dementsprechend zu beachten.....	39
<b>Abbildung 29 A zu B</b> dazugehöriges HPLC-Chromatogramm der <b>Seq. 1</b> nach der chromatografischen Aufreinigung am Varian System ( <b>6.1.1</b> ) mit einem Peak bei Minute 24.6, <b>B</b> LC-MS (Waters System <b>6.1.1</b> ) von <b>Seq. 1</b> nach der chromatografischen Aufreinigung am Varian System ( <b>6.1.1</b> ), kalkulierte Masse: 4683.5 Da, gemessene Masse: 4682.9 Da.....	40
<b>Abbildung 30</b> Grafische Darstellung der in gelb hervorgehobenen 2. Sequenz ( <b>Seq. 2</b> ) mit ihren synthetisch vorzunehmenden Modifikationen. ....	41

<b>Abbildung 31 A zu B</b> dazugehöriges HPLC-Chromatogramm der <b>Seq. 2</b> nach der chromatografischen Aufreinigung am Varian System ( <b>6.1.1</b> ) mit einem Peak bei Minute 24.8, <b>B</b> LC-MS (Waters System <b>6.1.1</b> ) von <b>Seq. 2</b> nach der chromatografischen Aufreinigung am Varian System ( <b>6.1.1</b> ), kalkulierte Masse: 4271.9 Da, gemessene Masse: 4271.9 Da.....	42
<b>Abbildung 32</b> Grafische Darstellung der in orange hervorgehobenen 3. Sequenz ( <b>Seq. 3</b> ) der Peptidkette aus <b>Abbildung 13</b> . <b>Seq. 3</b> benötigte keinerlei Modifikationen. ....	43
<b>Abbildung 33 A zu B</b> dazugehöriges HPLC-Chromatogramm der <b>Seq. 3</b> nach der chromatografischen Aufreinigung am Varian System ( <b>6.1.1</b> ) mit einem Peak bei Minute 25.9, <b>B</b> LC-MS (Waters System <b>6.1.1</b> ) von <b>Seq.3</b> , kalkulierte Masse: 2316.8 Da, gemessene Masse: 2316.0 Da. ....	44
<b>Abbildung 34 B</b> LC-MS (Waters System <b>6.1.1</b> ) von <b>Seq. 2</b> vor der Reinigung im Scheidetrichter ( <b>D</b> ), kalkulierte Masse: 4271.9 Da, gemessene Masse: 4271.9 Da. <b>C</b> <b>Seq. 2</b> vor der Reinigung im Scheidetrichter ( <b>D</b> ). ....	46
<b>Abbildung 35 B</b> LC-MS (Waters System <b>6.1.1</b> ) von <b>Seq. 2</b> nach der Reinigung im Scheidetrichter, kalkulierte Masse: 4271.9 Da, gemessene Masse: 4271.9 Da. <b>E</b> <b>Seq. 2</b> nach der Reinigung im Scheidetrichter. ....	46
<b>Abbildung 36</b> Schematische Darstellung der durchgeführten NCL von <b>Seq. 1</b> (blau) mit <b>Seq. 2</b> (gelb), sowie von <b>Seq. 2</b> (gelb) mit <b>Seq. 3</b> (orange).....	49
<b>Abbildung 37</b> Schematische Darstellung der Bausteine für die bevorstehende Kopplung zum Gesamtpeptidstrang via NCL. Die Sequenzabschnitte 1 bis 3 [ <b>Seq. 1</b> (blau), <b>Seq. 2</b> (gelb) und <b>Seq. 3</b> (orange)] und ihre erfolgreich eingebauten Modifikationen (Thioesterreste und Cys (grün) anstelle von Ala).....	51

## 2. Zusammenfassung

Membranproteine sind wichtige Ansatzpunkte und Zielmoleküle in der Forschung und Entwicklung von Medikamenten. Sie sind in essentiellen zellulären Prozessen involviert, unter anderem im Austausch von Informationen und Materialien, wie z.B. Kohlenhydraten, zwischen dem Zellinneren und dem Zelläußeren. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf einem Membranprotein aus dem Bakterium *Vibrio sp.* (Stamm N418) und zwar dem bestuntersuchteten SemiSWEET, einem Mono- und Disaccharidtransporter.

Üblicherweise wird das membranständige Zuckertransporterprotein der Spezies *Vibrio* per Expression aus *E. Coli* gewonnen. In dieser Arbeit wird erstmals gezeigt, dass es auf rein synthetischem Wege, mittels Festphasenpeptidsynthese (SPPS), gefolgt von nativer chemischer Ligation (NCL), aufgebaut werden kann. Durch den eingeschlagenen organischen Syntheseweg soll die Möglichkeit und der Zugang zur chemischen Modifizierung am Protein erleichtert werden. Dies eröffnet wiederum Optionen biochemische sowie mechanistische Fragestellungen zu verstehen, pKa-Werte der Aminosäureseitenketten am Protein zu beeinflussen, sowie gezielte strukturelle Änderungen vorzunehmen bzw. einzubringen, um somit die Eigenschaften des Proteins beeinflussen zu können. Dies stellt einen wichtigen Ansatzpunkt bei der Generierung neuer Therapeutika dar.

### 3. Abstract

Membrane proteins are important molecules, not only for research and development of new pharmaceuticals, but they are also involved in many key processes, for example the exchange of information and small molecules, like carbohydrates, through the cell membrane. In this work we want to focus on the best known SemiSWEET from the bacterium *Vibrio sp.* (strain N418), a di- and monosaccharide transporter protein in prokaryotic membranes.

The common approach for the preparation of this SemiSWEET is the expression in *E. Coli*. In this work we demonstrate the total synthesis of this membrane protein *via* SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis), followed by native chemical ligation (NCL). This utilized organic pathway facilitates the access and opportunity of modifications of the protein. This potentially enables solving biochemical and mechanistical questions, manipulation of the  $pK_a$ -values of amino acid sidechains and specific changes in the structure of the protein to influence those characteristics. This approach is an essential tool for the development of new therapeutics.

## 4. Abkürzungsverzeichnis

<b>α-</b>	alpha-
<b>Arg-tag</b>	Polyarginin-Tag
<b>Äquiv.</b>	Äquivalent(e)
<b>AS</b>	Aminosäure(n)
<b>β-</b>	beta-
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
<b>dd</b>	doppelt destilliert
<b>DMF</b>	Dimethylformamid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DPC</b>	Dodecylphosphocholin
<b>E. Coli</b>	<i>Escherichia Coli</i>
<b>FPPS</b>	<u>F</u> est- <u>P</u> hasen- <u>P</u> eptid- <u>S</u> ynthese (im Englischen SPPS)
<b>Gua</b>	Guanidin
<b>HBTU</b>	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
<b>HF</b>	Fluorwasserstoff
<b>HFIP</b>	Hexafluoroisopropanol
<b>Hmp</b>	2-Hydroxy-3-mercaptopropionsäure
<b>HPLC</b>	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (englisch: <u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
<b>iPrOH</b>	<i>iso</i> -Propanol
<b>konz.</b>	konzentriert(e)
<b>LC3-II</b>	Lipoprotein 1A/1B-light chain 3
<b>LPPS</b>	liquid-phase-peptide-synthesis
<b>M</b>	Mol pro Liter, mol/l, Molar
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MS</b>	Massenspektroskopie
<b>NaPi</b>	Natrium-Phosphat-Cotransporter
<b>NCL</b>	<u>N</u> ative <u>C</u> hemische <u>L</u> igation
<b>p-</b>	<i>para</i> -

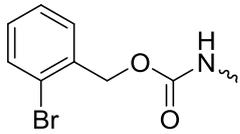
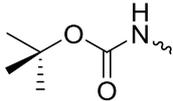
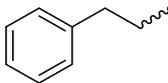
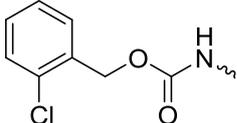
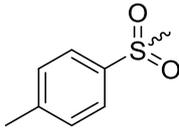
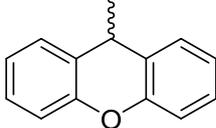
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>PhTFE</b>	Phenyltrifluorethanol
<b>pKa</b>	Gleichgewichtskonstante der Säure (acid)
<b>PPO</b>	Poly(ethylenglykol)polyamid-Tag
<b>RBM</b>	<u>r</u> emovable <u>b</u> ackbone <u>m</u> odification
<b>RP-HPLC</b>	Umkehrphase(n)-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (englisch: <u>R</u> eversed <u>P</u> hase - <u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
<b>RT</b>	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
<b>TFE</b>	Trifluorethanol
<b>THB</b>	<u>t</u> ripel <u>h</u> elikales <u>B</u> ündel
<b>TM1</b>	Transmembransegment 1
<b>TM2</b>	Transmembransegment 2
<b>TM3</b>	Transmembransegment 3
<b>TMS</b>	<u>t</u> rans <u>m</u> embranes <u>S</u> egment
<b>TOG</b>	<u>T</u> ransporter- <u>O</u> psin- <u>G</u> Protein-gekoppelter Rezeptor
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>s</b>	Sekunde(n)
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
<b>Seq.</b>	Sequenz
<b>SemiSWEET</b>	steht für das bakterielle Homolog zur Familie der Zuckertransportern SWEETs, in Prokaryoten, wörtliche Übersetzung: halbsüß
<b>SPPS</b>	<u>S</u> olid- <u>P</u> hase- <u>P</u> eptide- <u>S</u> ynthesis (im Deutschen FPPS)
<b>SWEET</b>	steht für die Familie der Zuckertransporter in Eukaryoten
<b><i>Vibrio sp.</i></b>	<i>Vibrionaceae species</i> (strain N418) (Genome: VIBRN418_06191)

### 3- und 1-Buchstabencode der 22 proteinogenen Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Gls	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Pyrrrolysin	Pyl	O
Selenocystein	Sec	U
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

**Abbildung 1** Tabellarische Auflistung der 22 natürlichen Aminosäuren mit ihren dazugehörigen 3- und 1-Buchstabencode.

## Abkürzungsverzeichnis der verwendeten Schutzgruppen

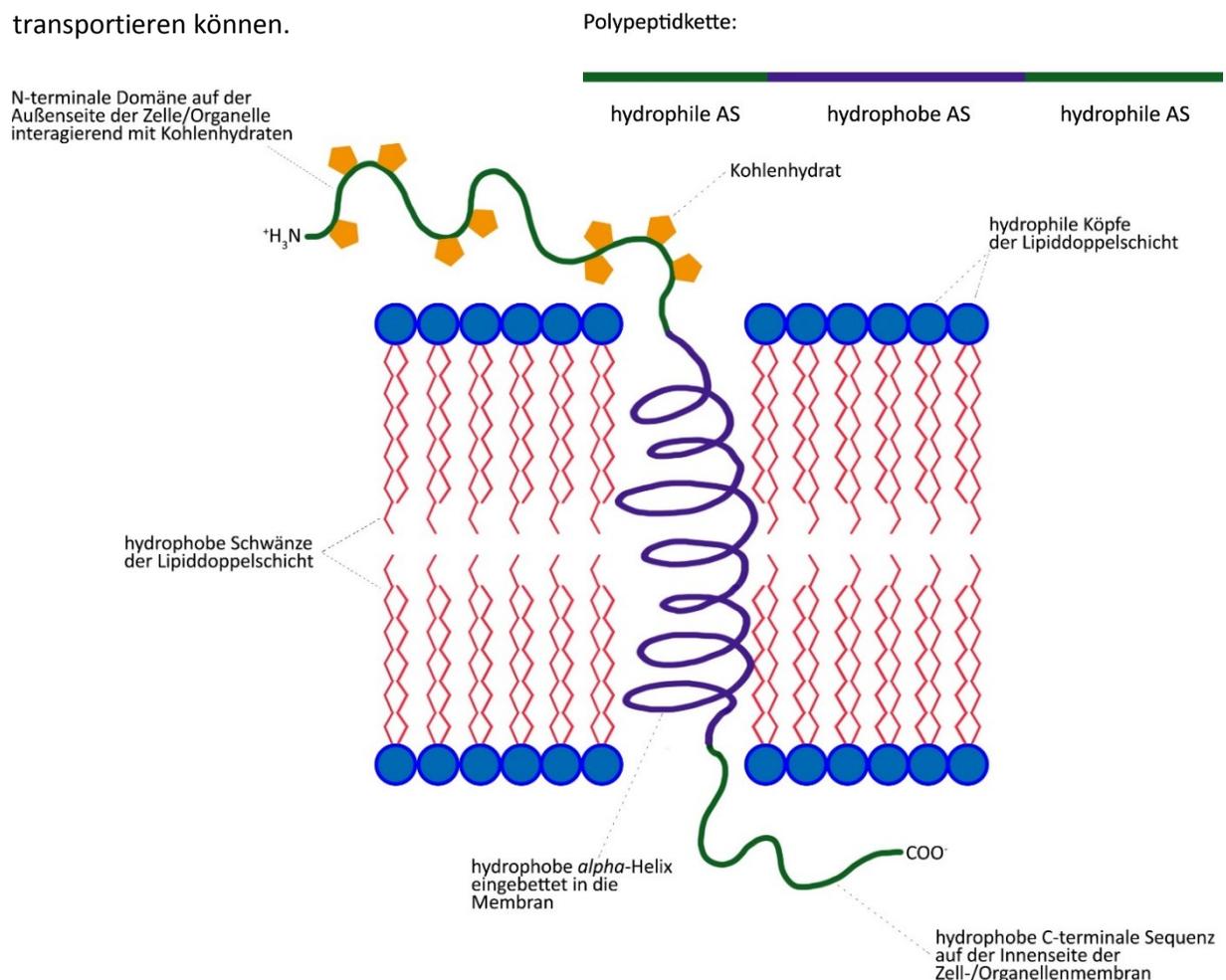
Systematischer Name	Abkürzung	Struktur
2-Bromo-benzyloxycarbonyl	2-Br-Z	
<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	BOC	
<i>O</i> -Benzyl	Bzl	
2-Chloro-benzyloxycarbonyl	2 ClZ	
<i>O</i> -Cyclohexyl	OcHx	
Tosyl	Tos	
Xanthenyl	Xan	

**Abbildung 2** Tabellarische Auflistung der verwendeten Schutzgruppen mit den dazugehörigen Abkürzungen sowie ihrer chemischen Struktur.

## 5. Einleitung

### 5.1 Membranproteine und deren Bedeutung

Membranproteine sind Proteine, die mit den Zellmembranen oder mit den Biomembranen der Zellbestandteile interagieren. Es gibt viele unterschiedliche Membranproteine mit unterschiedlichen Funktionen. Aus Membranen isolierte Proteine fungierten exakt gleich, eingebracht in synthetisch hergestellte Liposome, wie in einer Zellmembran. (William H. Elliott, 1997, 2001 and 2005) Membranproteine werden in zwei Gruppen eingeteilt, den Integralmembranproteinen und peripheren Membranproteinen. Integralmembranproteine sind lateral mobile Proteinmoleküle in einer zweidimensionalen Lipidschicht, in welche sie eingebettet sind oder diese ganz durchqueren. Integralmembranproteine wechselwirken somit mit den hydrophoben Molekülen der inneren Membranschicht. Hingegen periphere Proteine nur mit dem Randgebiet der Lipidschicht assoziieren und somit nur an einer Seite der Membran lokalisiert sind. In dieser Arbeit wird genauer auf Integralmembranproteine eingegangen, welche hydrophile Zuckermoleküle durch die Lipidschicht transportieren können.



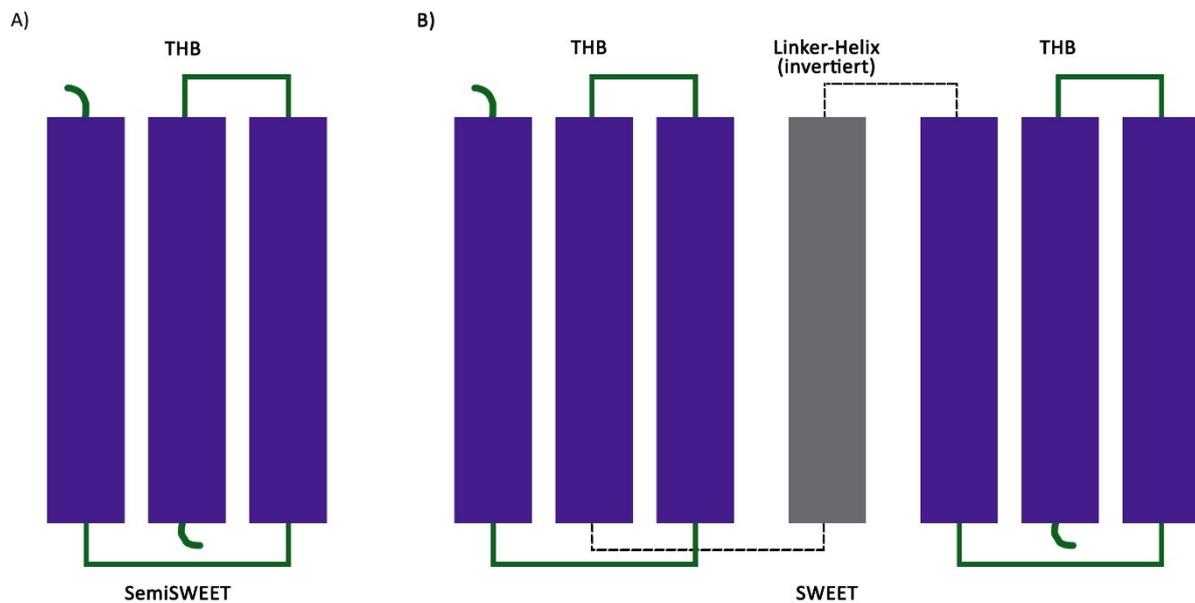
**Abbildung 3** Schematische Darstellung eines Integralmembranproteins, welches Kohlenhydrate durch die Doppelschicht der Membran transportiert.

Die meisten Integralmembranproteine sind so aufgebaut, dass sie durch nichtkovalente Wechselwirkungen in Position innerhalb der Lipiddoppelschicht gehalten werden. Integralmembranproteine mit *alpha*-Helices sind amphipatisch, wobei die  $\alpha$ -helikalen -Einheiten hydrophob sind und die beiden Enddomänen (C- und N-Terminus) hydrophil sind (**Abbildung 3**). Die guten  $\alpha$ -helices-Former und stark lipophilen Aminosäuren, wie Ile, Leu, Phe, Met, und Val sind in der  $\alpha$ Helix dominant. Hingegen die hydrophilen Aminosäuren wie, Ser, Thr und Asn, an die sich Kohlenhydrate binden können, vermehrt an den terminalen Domänen zu finden sind.

## 5.1.1 Zuckertransporter

### 5.1.1.2 Unterschied SWEETs & SemiSWEETs

SWEETs und deren prokaryotische Homologe, die sogenannten SemiSWEETs, sind Mono- und Disaccharidtransporter, welche in sehr vielen Lebensformen von Archaeen über Pflanzen bis hin zum Menschen zu finden sind (Sosso, 2013) (Chen, 2010) (Xuan, 2013). SWEETs erleichtern den Zuckertransport durch die pflanzliche Plasmamembran und die Membran des Endoplasmatischen Retikulums, weshalb die SWEETs einen Schlüsselschritt im Zuckertransport innerhalb des Phloems von Pflanzen (Chen, 2012), im Ernähren von Pollen (Sun, 2013) und in der Nektarsekretion (Lin, 2014), einnehmen. SWEETs gehören zur großen TOG Superfamilie (Transporter-Opsin-G Protein-gekoppelter Rezeptor) der Integralmembranproteine. Die bakteriellen Homologen, die SemiSWEETs, gehören wiederum zur Familie der SWEETs, aber unterscheiden sich strukturell insofern dass sie nur halb so groß sind und aus nur einem tripelhelikalen Bündel (THB) bestehen (**Abbildung 4**) (Daniel C. Yee, 2013) (Liang Feng, 2015).

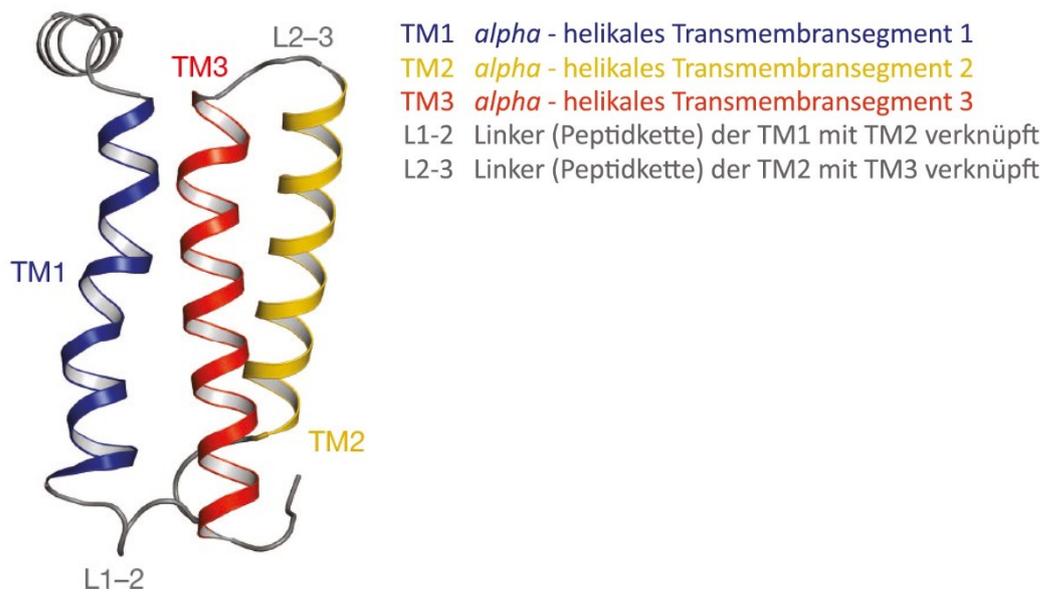


**Abbildung 4** Schematische Darstellung der A) SemiSWEET und B) SWEET Topologie. A) SemiSWEET aufgebaut aus einem tripelhelikalen Bündel (THB) in der Konformation 1 - 3 - 2. B) SWEET aufgebaut aus zwei THBs verknüpft über eine invertierte Linker-Helix.

Halbseitige Transporter benötigen die Anwesenheit einer zweiten Polypeptidkette, die entweder eine Kopie des gleichen Peptidstranges ist, um ein Homodimer zu formen, oder die eine Kopie einer anderen aber homologen Peptidkette ist, um ein Heterodimer zu bilden (M. H. Saier, 2003). Damit der Transporter aktiv sein kann, müssen beide Untereinheiten im Komplex vorhanden sein (Y. J. Chung, Mar 2001) (Kaplan, Feb 2001) (L. M. Veenhoff, 1st May 2002).

### 5.1.1.3 Fokus: Bakterielle Zuckertransporter, SemiSWEET's

SemiSWEETs sind tripelhelikal in einer Konformation 1 - 3 - 2 von drei transmembranen,  $\alpha$ -helikalen, hydrophoben Segmenten (TMS) aufgebaut (**Abbildung 5**), dem sogenannten tripelhelikalen Bündel (**Abbildung 4**) (Yan Xu, Nov 2014) (Liang Feng, 2015). Hierbei ist TM3 wie ein Sandwich zwischen TM1 und TM2 eingeschlossen.

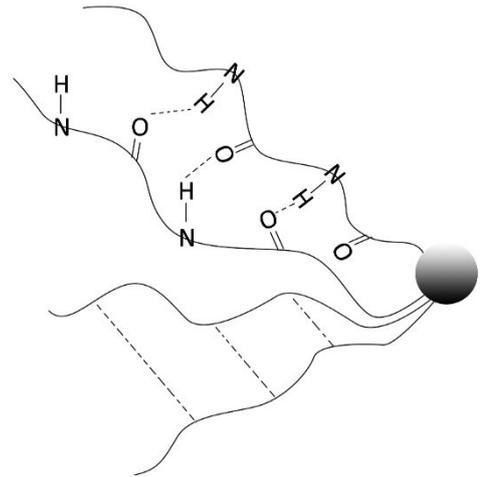
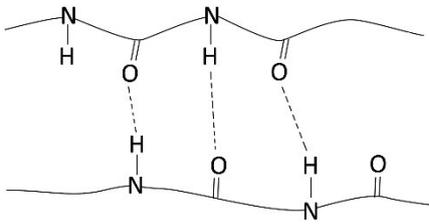


**Abbildung 5** Seitenansicht des *Vibrio sp.* SemiSWEET Protomers im Bändermodell mit, in unterschiedlichen Farben hervorgehobenen, TM1, TM3 und TM2 Helices, welche über Loops (Schleifen) verknüpft sind. (Yan Xu, Nov 2014)

SemiSWEETs sind Uniporter (Li-Qing Chen, 2015) die als Dimer eine Pore bilden (Yan Xu, Nov 2014), welche durch Konformationsänderungen Kohlenhydrate durch die lipophile Membran bewegen (Liang Feng, 2015). Solch Bewegungen nennt man Schaukelbewegungen (rocking-type movement) (Yan Xu, Nov 2014). Hierbei durchlaufen SemiSWEETs zwei Konformationen, -inward open- und -occluded empty-, lautet die Hypothese von Yan Xu 2014. SemiSWEETs werden daher als Transporter und nicht als Kanäle bezeichnet. Es bleibt noch auszuschließen, ob der Transportzyklus an einen Protonentransfer, oder an erleichterte Diffusion, gekoppelt ist. In der Arbeit von Yan Xu 2014 wird auch berichtet, dass Trp und Asn Seitenketteninteraktion mit Zuckermolekülen zeigten und die Punktmutation dieser Reste zu Alanin, die Hexose-Transportfähigkeit der SemiSWEETs unterbindet und daher eine entscheidende Rolle für den Zuckertransport in SemiSWEETs spielen.

## 5.2 Synthesemethoden von Membranproteinen

Membranproteine und Transmembranpeptide sind zu einem hohen Anteil aus lipophilen Sequenzen aufgebaut. Ihre chemische Synthese, sowie ihre Handhabung während der Synthese, der anschließender Aufreinigung und Charakterisierung, stellt eine Herausforderung dar. (C. F. Becker, 2008) Um Membranproteine rein chemisch aufzubauen kann die SPPS oder die LPPS (liquid-phase-peptide-synthesis) herangezogen werden. Hürden, wie schlechte Löslichkeit aufgrund der vermehrten hydrophoben Abschnitte im Syntheseprodukt, unvollständige Kopplungsreaktionen, Razemisierung, Ausbildung von unerwünschten Sekundärstrukturen, sowie Aggregation von Resin-gebundenen Peptiden (**Abbildung 6**), heißt es hierbei zu überwinden. (M. Mutter, 1985)



**Abbildung 6** Darstellung der Wechselwirkungen, wie die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, innerhalb der Resin-gebundenen Peptide, welche während der Peptidsynthese mittels LPPS sowie SPPS auftreten können und zur Aggregation des Peptides führen und stabilisieren. (C. Hyde, 1992)

In **Abbildung 6** sind die nichtkovalenten Wechselwirkungen des Peptidgrundgerüsts während der LPPS und SPPS dargestellt. Hierbei bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den H-Atomen der Amide mit den Carbonyl-Sauerstoffen, welche zur Aggregation der Harz-gebundenen Peptide führen und diese stabilisieren. Je nachdem welche Aminosäuren bzw. Aminosäureschutzgruppen die Sequenz trägt, von welcher Natur das N<sup>α</sup>-substituierte Amid ist und welche Lösungsmittelzusammensetzung während der Peptidsynthese eingesetzt wird, bilden sich diese Peptidcluster mehr oder minder aus. (R. C. de L. Milton, 1990), (K. C. Pugh, 1992) Auch wird berichtet, dass die Beladung des Harzes eine Rolle bei der Formierung von Sekundärstrukturen während der Peptidsynthese spielt. Je mehr ein Resin beladen wird und je länger die Peptidverlängerung fortgesetzt wird, desto wahrscheinlicher kommt es zu Aggregationen der Resin-gebundenen Peptide. Die SPPS sowie die LPPS bauen für eine erfolgreiche Synthese vom C- zum N-Terminus auf durchdachte Schutzgruppenchemie. Demzufolge ist es nötig während der Peptidsynthese die Seitenketten der Aminosäuren permanent zu schützen, die  $\alpha$ -Aminogruppe temporär mittels einer der Urethan-Schutzgruppen, Fmoc (Fluorenylmethoxycarbonyl) oder Boc (*tert*-Butyloxycarbonyl), um eine Reaktion mit sich selbst zu vermeiden, und zusätzlich die Carbonsäure für die Peptidkopplung zu aktivieren. Hier ist zu beachten, dass je nach Peptid sich entweder die Fmoc- oder die Boc-Strategie besser eignet. Beispielsweise treten bei der Boc-basierten SPPS Aggregationen von Resin-gebundenen Peptiden (**Abbildung 6**) seltener auf, da diese durch die wiederholte Protonierung mittels TFA verhindert werden. Die Anknüpfung von Lipidketten an den C-Terminus des Peptids, erfolgt meist per Thioestern oder Thioethern. Diese zwei Bindungsarten sind nicht mit der herkömmlichen Fmoc-basierten SPPS und der damit verbundenen Entschützungschemie kompatibel (C. F. Becker, 2008) Hier sind andere Synthesestrategien von Nöten. (B. Ludolph, 2003), (L. Brunsveld, 2005) Demzufolge wird für die Synthese von schwierigen

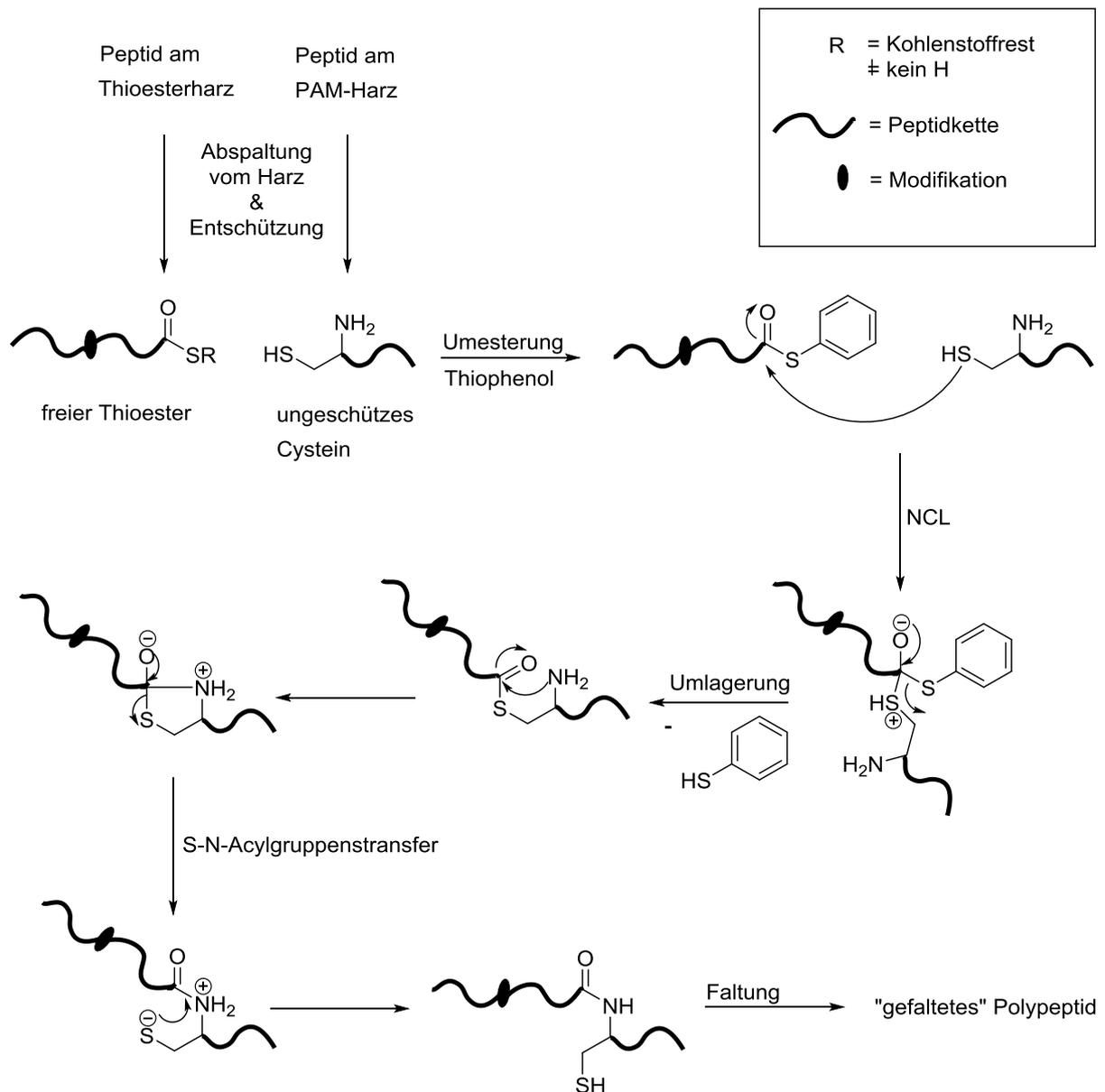
hydrophoben Peptidsequenzen gerne die Boc-SPPS herangezogen und über diesen Weg von einer verbesserten Synthesequalität berichtet. (C. F. Becker, 2008), (G. G. Kochendoerfer, 1999), (M. Beyermann, 1992) Jede neue Synthese von solch herausfordernden Membranproteinen und Transmembranpeptiden benötigt Optimierung, sowie ebenso ihre Aufreinigung und Handhabung. (C. F. Becker, 2008)



**Abbildung 7a** Am Foto ist die verwendete HF-Anlage abgebildet, welche zur Boc-Einschützung und Abspaltung der Peptide von der stationären Phase verwendet wurden.

Ein großer Vorteil der Fmoc-Strategie, im direkten Vergleich zur Boc-Strategie, wäre, dass die Synthese inklusive der Abspaltung, teilweise bis vollständig, mit Hilfe eines Synthesizers automatisiert erfolgen kann. Die Abspaltung sowie die Entschützung sind milde und nicht wie bei der Boc-Strategie mittels *in situ* hergestelltem HF, wo eine eigene HF-Anlage notwendig ist (siehe **Abbildung 7a**), durchzuführen. Hinzu kommt, dass die Entschützung mittels sekundärer Amine, bei der Fmoc-Variante, mit UV-Detektion verfolgbar ist. Für die Synthese des Polypeptids aus dem Bakterium *Vibrio sp.* wurde die Boc-Methode angewendet und per Hand synthetisiert, da Berichten zufolge, die Boc-SPPS bei der Synthese von Membranproteinen die gebräuchliche Vorgehensweise ist und von guten Syntheserfolgen berichtet wurde. (C. F. Becker, 2008), (C. F. Becker, 2011), (C. F. W. Becker, 2004) Ebenso ist die Boc-Strategie ist eine billige und zuverlässige Methode, die gerne beim Arbeiten mit basenlabilen Komponenten verwendet wird.

Die routinemäßige Peptidkopplung weist eine Größenlimitierung von 50 AS auf und diese Größe benötigt bereits gewisse Übung. Das in dieser Arbeit zu synthetisierende Membranprotein ist aus 97 AS aufgebaut. Demzufolge ist es notwendig dieses aus sinnvoll unterteilten Peptidfragmenten aufzubauen, und anschließend zum Polypeptid zusammen zu fügen. Hierfür müssen kleine synthetische Modifikationen an den einzelnen Peptidsegmenten vorgenommen werden, um in späterer Folge die Peptidfragmente über die Methode der Nativen Chemischen Ligation (NCL, siehe **Abbildung 7b**) zu verknüpfen. Die NCL wurde von Wieland 1953 entdeckt, womit es erstmals möglich war chemisch synthetisierte ungeschützte Peptidsegmente aneinander zu koppeln.



**Abbildung 7b** Mechanismus der Nativen Chemischen Ligation (NCL) bis hin zur „Faltung“ des Polypeptids.

Ein Thioester an der  $\alpha$ -Carboxylgruppe der C-terminalen AS des N-terminalen Peptids ist für die NCL Voraussetzung, sowie ein Cys am N-Terminus des C-terminalen Peptids. Die Thiolgruppe des Cys greift den *in situ* erzeugten Phenylthioester an. Es folgt eine Umesterung (Thioesteraustausch), wobei die zwei Peptidsegmente in eine ideale räumliche Anordnung gebracht werden und eine Amidbindung, nach dem nukleophilen Angriff, ausgebildet wird. Rein theoretisch können mit Hilfe der NCL beliebig viele Peptidfragmente gekoppelt werden. In der Praxis hingegen weist diese Reaktion allerdings ein Größenlimit von etwa 180 AS und 4 Ligationsschritten auf, welches sich durch die SPPS und die Verluste bei der Aufreinigung nach jeder NCL, zusammensetzt.

Mit der chemischen Totalsynthese des Ionenkanals aus dem Influenza A Virus, das M2 Protein, erfolgte ein signifikanter Fortschritt in der Peptidchemie und in der Anwendung der NCL. (G. G. Kochendoerfer,

1999). Dieses Protein stellt das Target für die Pharmaka Rimantadine und Amantadine dar, zwei anti-Influenza Medikamente. Hierbei hilft das Influenza A M2 Protein das Virion freizulegen. Dieses Protein besteht aus 97 Aminosäuren. Es ließ sich über Boc-SPPS, unter Verwendung eines C $\alpha$ -Thioesters am Lysin (Position 49), einem Cys an Position 50 und anschließender NCL beider Segmente, von Kochendoerfer *et al.* aufbauen. Für den Ligationsschritt wurden die Peptidsegmente mittels 6 M Guanidiniumchlorid und 20% TFE in Lösung gebracht, was zu einer Produktformierung von 65% führte. (G. G. Kochendoerfer, 1999)

19 Jahre später, griff Tietze *et al.* die Arbeiten von Danishefsky (J. D. Warren, 2004), (G. Chen, 2006), Guo (J.-S. Zheng, 2011) und der ebenso relevanten Arbeit von Liu *et al.* (F. Liu, 2013) auf, und entwickelte an Hand dieser Forschungserkenntnisse, eine robuste Strategie zur Synthese von stark hydrophoben Peptiden, ins Besondere Membranproteinen, am Beispiel des Influenza B M2 Protonenkanals {BM2 (1-51)}. (A. A. Tietze, 2018) Hierbei wurde die NCL zweier Fragmente angewandt, wobei das Thioesterfragment über ein Oxoester-Peptid mittels Fmoc-SPPS synthetisiert wurde. Mit dieser Strategie ist es nun möglich den Solubilizing Tag in nur einem Schritt während der NCL abzutrennen. Dabei diente die Thioester-formende Hmp-Einheit als abspaltbarer Linker zwischen dem Solubilizing Tag und dem Peptid. Die Solubilizing Tags wie ADO, ADO<sub>2</sub> und ADO-Lys, zeigten gute Kompatibilität mit diesem System. Tietze *et al.* berichteten in Ihrer Arbeit von einem nahezu quantitativen Ligationsumsatz. (A. A. Tietze, 2018)

In dieser Arbeit wurde ein Polypeptid mit 97 AS synthetisiert, welches über Boc-SPPS und zwei Ligationsschritten, unter Verwendung zweier C $\alpha$ -Thioester an **Seq. 1** und **Seq. 2**, aufgebaut wurde. Nämlich, das SemiSWEET aus dem Bakterium *Vibrio sp.*, einem Mono- und Disaccharidtransporter.

Wenn nun Peptide, größer als 180 AS, synthetisiert werden sollen, kann auch die Methode des sogenannten „Protein-Splicen“, auch „Intein-Splicen“ genannt, angewendet werden. Hierbei wird der Großteil des Proteins mittels Expression in *E. Coli* gebildet und nur die zu modifizierenden Abschnitte mittels Peptidsynthese. Dieser Synthesevorgang fällt unter den Begriff der Semisynthese von Proteinen. Dies war erst durch die Entdeckung der sogenannten Inteine möglich. Inteine sind Polypeptide die sich selbst aus Proteinen schneiden können und die übrig bleibenden Proteinsegmente mit einer Peptidbindung verknüpfen, was ähnlich zu verstehen ist wie „RNA-Splicen“ (**Abbildung8**). (A. A. Cooper, 1993)

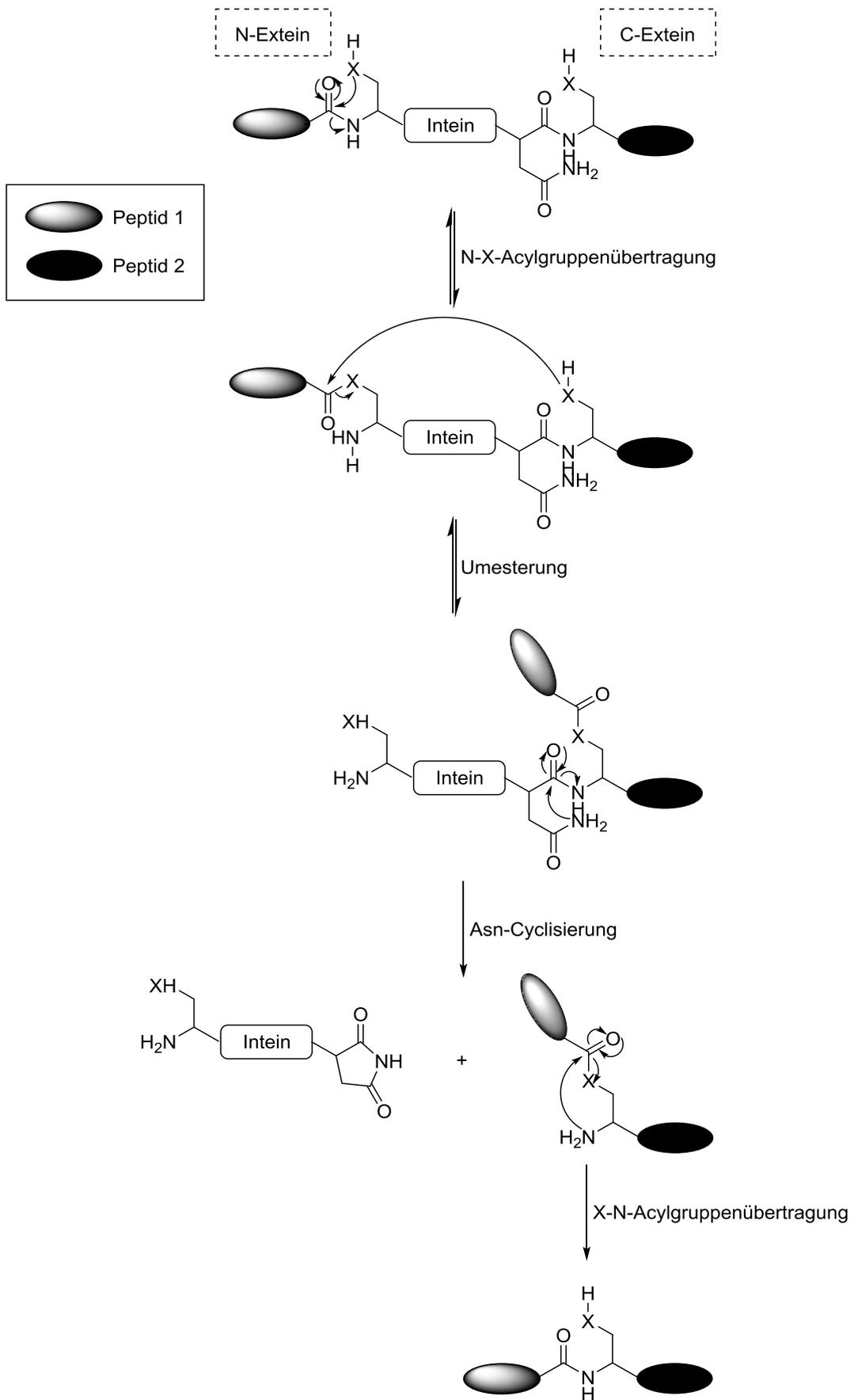


Abbildung 8 Mechanistische Darstellung von „Protein-Splicen“. (C. J. Norren, 2000)

Durch ein Cys, Ser oder Thr am N-Terminus des Inteins, kommt es zu einer Acylgruppenübertragung, gefolgt von einer Umesterung, die eine Konformationsänderung zur Folge hat, welche wiederum die Cyclisierung des C-terminalen Asn des Inteins begünstigt und somit das Herausschneiden beendet. Zuletzt werden beide Peptide über eine Amidbindung, mittels X-N-Acylgruppenübertragung, verbunden.

Neben den bereits genannten Methoden, um das Zielprotein zu gewinnen, kann dieses auch mittels *E. Coli* exprimiert werden. Unter Expression eines Proteins, auch Exprimierung oder Genexpression genannt, versteht man die Biosynthese von Proteinen. Hierbei werden, nach Vorgabe genetischer Information, Proteine aus Aminosäuren in Zellen neugebildet.

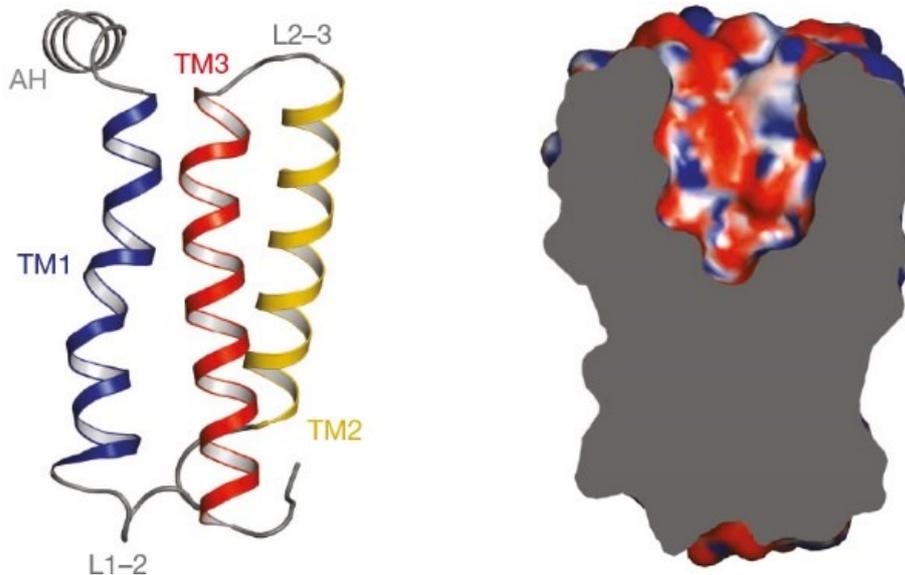
## 5.3 Warum Synthese statt Expression?

Die synthetische Produktion von stark hydrophoben Peptiden, wie mittelgroße Membranfragmente, welche das aktive Zentrum repräsentieren, bieten viele Vorteile gegenüber anderen Synthesewegen, wie unter anderem der Proteinexpression. Der Hauptgrund ist, da auf diesem Wege die Peptide derivatisiert, sowie modifiziert werden können und somit individuell an Versuchsbedingungen und Wünschen angepasst werden können, (Sato, 2015), (Sato, 2016) was unter anderem eine wichtige Rolle in der Forschung der Struktur-Wirkungsbeziehung von Membranproteinen und in der Medikamentenentwicklung spielt.

Des Weiteren ist vermutlich die Produktion von multi-Milligramm an Membranproteinfragmenten über die chemische Synthese von größerer Bedeutung, mit Respekt gegenüber der Entwicklung biologisch inspirierter Materialien. (X. Hou, 2009)

## 5.4 Ziel dieser Masterarbeit

Das Membranprotein des Bakteriums *Vibrio sp.*, dargestellt in **Abbildung 9**, soll auf synthetischem Wege, mittels Totalsynthese, gewonnen werden, um die Vorteile (siehe Abschnitt **5.3.**), gegenüber bakterieller Expressierung mittels *E. Coli*, zu gewährleisten.



**Abbildung 9** Seitenansicht des zu synthetisierenden Membranproteins im Bändermodell, *Vibrio sp.* SemiSWEET Protomers und eine dazugehörige Seitenansicht im Längsschnitt (slab view) mit farblicher Markierung des elektrostatischen Potentials (rot = negativ, blau = positiv). (Yan Xu, Nov 2014)

Hierfür soll der Polypeptid (**Abbildung 10**) in drei nahezu gleich große Teile unterteilt (gekennzeichnet durch Farbbereiche) und mittels Boc-SPPS Strategie synthetisiert werden.

MALIERIGKA	LEPLMLVMGL	ISPLATMPQL	YKLYVSHSEH	ALGLSLTTWL	LYSFIALLWT	IYGIYHKNPT	IWVGN	CLGFL	MYVAMVVGII	AHTGGTY
------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	-------	-------	------------	---------

**Abbildung 10** Grafische Darstellung des *Vibrio sp.* Proteinstranges mit farblich gekennzeichneten Gliedern der zu synthetisierenden Peptidsequenzen **Seq. 1** (blau), **Seq. 2** (gelb) und **Seq. 3** (orange).

Anschließend sollen die drei Peptidsequenzen jeweils mittels HPLC gereinigt und per Massenspektrometrie analysiert werden. Hierfür muss der Löslichkeitsbereich der jeweiligen Sequenzen und die optimalen Auftrennungsbedingungen ergründet werden. Zur Abrundung der Masterarbeit soll die Kopplung dieser drei Sequenzen mittels NCL (Native Chemische Ligation) durchgeführt werden und mittels MS der Erfolg der Ligationen bestätigt werden. Um die Peptidsequenzen miteinander koppeln zu können, müssen kleine Modifikationen bereits während der Synthese an den Sequenzen vorgenommen werden. Aus **Abbildung 11** ist zu entnehmen, dass am C-Terminus von **Seq. 1** ein  $\alpha$ -Thioester eingebaut werden muss, bei **Seq. 2** ebenso am C-Terminus eine Thioester-Gruppe nötig ist und zusätzlich noch am N-Terminus Ala gegen Cys getauscht werden muss.

Seq. 3 hat vorteilhafter Weise bereits ein Cys an der Schnittstelle (N-Terminus) welches für die NCL herangezogen wurde.



**Abbildung 11** Schematische Darstellung der drei zu synthetisierenden Peptidstränge mit ihren gekennzeichneten, für die nachfolgende NCL nötigen, Modifikationen.

Somit könnten sich nachfolgenden Arbeiten mit der Reinigung des Polypeptids, dessen Faltung zum Membranprotein und anschließende Experimente zum Kohlenhydrataustausch, befassen.

## 6. Materialien, Methoden und Synthesen

### 6.1 Materialien

#### 6.1.1 Instrumente

Beschreibung	Name	Firma
<b>Analysewaage</b>	Sartorius TE 124S	Sartorius
<b>HPLC (Varian)</b>	Varian HPLC	Varian
<b>LC-MS (Waters)</b>	Waters Auto Purification HPLC/MS System	Waters
<b>Lyophilizer</b>	Christ Alpha 2 - 4 LD plus	Christ
<b>HPLC (Charly)</b>	UltiMate 3000 LC System	Thermo Scientific
<b>Präzisionswaage</b>	M-Prove AY 511	Sartorius
<b>Einkanalpipetten</b>	Pipetman (in den Größen von 2 - 1000 µl)	Gilson
<b>Thermomixer</b>	Thermomixer Comfort	Eppendorf
<b>Trockenthermostat</b>	Techne Dri-Block DB 2A	Techne
<b>Reagenzglasschüttler</b>	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc.
<b>Zentrifuge</b>	Centrifuge 5418	Eppendorf
<b>Zentrifuge</b>	Sigma 3 - 16 PK	Sigma

Abbildung 12 Tabellarische Auflistung der verwendeten Instrumente.

## 6.1.2 Chemikalien

### 6.1.2.1 Aminosäuren

Name	Einbuchstaben-Code	Firma
Boc - Ala - OH	<b>A</b>	OPC Orpegen Peptide Chemicals GmbH
Boc - Arg(Tos) - OH	<b>R</b>	Novabiochem®
Boc - Asn (Xan) - OH	<b>N</b>	OPC Orpegen Peptide Chemicals GmbH
Boc - Cys - OH	<b>C</b>	Fluka Chemie GmbH
Boc - Gln(Xan) - OH	<b>Q</b>	OPC Orpegen Peptide Chemicals GmbH
Boc - Glu(OcHx) - OH	<b>E</b>	OPC Orpegen Peptide Chemicals GmbH
Boc - Gly - OH	<b>G</b>	OPC Orpegen Peptide Chemicals GmbH
Boc - His(Tos) - OH	<b>H</b>	OPC Orpegen Peptide Chemicals GmbH
Boc - Ile - OH*0.5 H <sub>2</sub> O	<b>I</b>	OPC Orpegen Peptide Chemicals GmbH
Boc - Leu - OH*H <sub>2</sub> O	<b>L</b>	Iris Biotech GmbH
Boc - Lys(2 ClZ) - OH	<b>K</b>	Novabiochem®
Boc - Met - OH	<b>M</b>	Aldrich® Chemistry
Boc - Phe - OH	<b>F</b>	Orpegen Pharma
Boc - Pro - OH	<b>P</b>	OPC Orpegen Peptide Chemicals GmbH
Boc - Ser(Bzl) - OH	<b>S</b>	OPC Orpegen Peptide Chemicals GmbH
Boc - Thr(Bzl) - OH	<b>T</b>	Novabiochem®
Boc - Trp - OH	<b>W</b>	Orpegen Pharma
Boc - Tyr(2-Br-Z) - OH	<b>Y</b>	Iris Biotech GmbH
Boc - Val - OH	<b>V</b>	OPC Orpegen Peptide Chemicals GmbH

Abbildung 13 Tabellarische Auflistung der verwendeten Aminosäuren.

## 6.1.2.2 Resins

Name	Firma
PAM-Resin	Iris Biotech GmbH

Abbildung 14 Tabellarische Auflistung der verwendeten PAM-Harze als stationäre Phase für die Peptidsynthese.

## 6.1.2.3 Lösungsmittel

Name	Abkürzung	Firma
Dichlormethan > 99.8%	DCM	Sigma-Aldrich®
Dichlormethan für HPLC	DCM für HPLC	VWR® BDH® Chemicals
Diethylether > 99.5%	Et <sub>2</sub> O	Carl Roth®
Piperidin ReagentPlus® 99%		Sigma-Aldrich®

Abbildung 15 Tabellarische Auflistung der verwendeten Lösungsmittel.

## 6.1.2.4 Reagenzien

Falls nicht anders angeführt, wurden alle Chemikalien von Sigma Aldrich® angekauft und die Lösungsmittel vor Gebrauch frisch destilliert.

## 6.1.2.5 Pufferlösungen

Verwendete Pufferlösungen wurden vor Gebrauch frisch abgemischt und entgast.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Puffer A	0.1% TFA in <i>ddH</i> <sub>2</sub> O
Puffer B	0.08% TFA in Acetonitril
Puffer C	<i>i</i> PrOH : ACN : H <sub>2</sub> O, 6 : 3 : 1, 0.1% TFA
Puffer D	6 M Gua*HCl (pH 4.6)

Abbildung 16 Tabellarische Auflistung der verwendeten Pufferlösungen mit ihrer Zusammensetzung.

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Analytische Methoden

#### 6.2.1.1 Varian (HPLC)

Für die Aufreinigung der Rohpeptide und für die Endreinigung der **Seq. 1 bis 3** wurde ein Varian HPLC System (**6.1.1**), mit stets denselben zwei präoperativen C4-Säulen (Kromasil® 300 - 5 C4 250 x 10 mm für geringere Probenmengen und Kromasil® 300 - 10 C4 250 x 21.2 mm für große Probenmengen), verwendet. Die Injektionen erfolgten manuell. Die Fraktionen (bis zu 15 ml) wurden, wenn nicht anders vermerkt, alle 30 s bei einer Flussrate von 10 ml/min, auf der großen C4-Säule, oder im Falle kleinerer Mengen 3 ml/min, auf der kleineren C4-Säule, chromatografiert, in Glaseprouvetten per Autosampler gesammelt und im Reck mit Alufolie abgedeckt im Kühlschrank bei 9 °C, bis zur Analyse am Waters

System (siehe **6.2.1.2**), gelagert. Für den Fall das etwas während der Aufreinigung schief laufen würde, wurde stets der Waste (= Lösungsmittelabfall) aufbewahrt, bis bestätigt wurde, dass die Säulung erfolgreich war und kein Produkt im Ausguss landen würde.

### 6.2.1.2 Waters (LCMS)

Für die Massenspektrometrie wurde ein Waters System (**6.1.1**) mit direkter Injektion verwendet.

### 6.2.1.3 Charly (HPLC / RP-HPLC)

Proben die eine Analyse zur Identifikation benötigten aber vom Volumen her zu gering für MS am Waters System (**6.1.1**) waren, aber auch zur Doppelten Absicherung, wurden mittels Charly (HPLC-MS, **6.1.1**), 1 ml/min von 5 - 65% Puffer B, 3% in der min, gemessen. Dies ermöglichte eine Auftrennung m/z mit anschließender Bestimmung der Peptide und ihrer Nebenprodukte anhand ihrer Massenzahl, selbst im µg Bereich.

## 6.2.2 Chemische Methoden

### 6.2.2.1 FPPS von Peptiden

Alle drei Peptidsequenzen (**Seq. 1**, **Seq. 2** und **Seq. 3**) wurden manuell mittels Festphasenpeptidsynthese (FPPS) synthetisiert. Die Synthesen aller C-terminalen Peptide wurden an einem speziellen Thioester-Pam-Harzen durchgeführt, um eine, für die Native Chemische Ligation (NCL) notwendige, Thioester-Gruppe im Abspaltungsschritt frei zu legen. (L. E. Canne, 1995) (P. E. Dawson, 1994) (H. Hojo, 1993) Diese Thioester-Harze wurden von Univ. Ass. Prof. Dr. Becker mit der ersten Aminosäure gekoppelt zur Verfügung gestellt. Die Peptidsequenzen wurden mittels Boc-Strategie aufgebaut und dafür wurden Boc-Aminosäuren verwendet deren Seitenketten wie folgt geschützt waren: Arg(Tos), Asn(Xan), Gln(Xan), Glu(OcHx), His(Tos), Lys(2ClZ), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Tyr(2-Br-Z). Alle weiteren, hier nicht angeführten, Seitenketten der verwendeten Aminosäuren waren ungeschützt.

Die Synthese wurde unter dem Abzug in einer Glasfritte (Porengröße 3), welche über eine Saugflasche und einer zwischengeschalteten Lösungsmittelauffangflasche ans Vakuum angeschlossen war, durchgeführt. Die Synthesen der drei Peptidsequenzen erfolgten jeweils in einem Maßstab von 0.2 mmol (für **Seq. 2** in 0.4 mmol).

Für die manuelle Synthese einer Peptidsequenz mittels FPPS wurde das Thioester-Harz für 20 min in DMF quellen gelassen. Inzwischen die zu koppelnde erste Aminosäure (2 mmol) in einem kleinen Glasgefäß eingewogen und kurz vor dem Ende der 20 min 3.8 ml einer 0.5 M HBTU-Lösung (mmol) hinzugegeben. Als nächster Schritt wurde das Resin in der Nutsche trocken gesaugt, zweimal mit konz.

TFA gewaschen und anschließend 1 min bedeckt mit konz. TFA stehen gelassen, abgesaugt und erneut 1 min mit konz. TFA stehen gelassen. Während dieser letzten Minute wurde 1 ml DIEA zur Aminosäure hinzugegeben, um diese für die Kopplung zu aktivieren. Bevor nun die aktivierte Aminosäure gekoppelt werden konnte, mussten die Harzkügelchen vom TFA befreit werden, indem man 1 min mit DMF wäscht. Für den besseren Kopplungserfolg, wurde zuerst 1 ml der aktivierten Aminosäure auf das DMF gewaschene, getrocknete Resin aufgetragen und gleich wieder abgesaugt. Anschließend wurden die restlichen Milliliter der zu koppelnden Aminosäure in die Nutsche geleert und für 12 min, nach vorsichtigem rühren mit einem Glasstab, stehen gelassen. Nach den 12 min wurde 1 min gründlich mit DMF gewaschen. An dieser Stelle des Syntheseprozesses konnte eine Probe des Resins genommen werden, um später den Kopplungsfortschritt zu verfolgen. Da bei der Boc-Synthese der Ninhydrinnachweis erst nach einer vollzogenen Entschützung mittels *in situ* hergestellten HF erfolgen kann und dazu eine etwas größere Probenmenge, als üblicherweise für eine Ninhydrinprobe, nötig ist, war es sinnvoll die Proben gezielt und nur wenn nötig zu ziehen. Das Thioester-Harz war in DMF mit etwa 3 ml überstehendem Lösungsmittel einige Tage bei Raumtemperatur lagerfähig. Falls die Kopplung nicht erfolgreich war oder unvollständig, wurde die Inkubation auf die gleiche Weise mit einer frisch präparierten aktivierten Aminosäure für 12 min durchgeführt. Dies wird als Doppelkopplung bezeichnet, welche beim Koppeln von Arg, Thr und Val auf Val immer durchgeführt wird, da aus Erfahrung bekannt ist, dass diese unvollständig ablaufen. Um die Peptidsynthese fortzusetzen, wurden 3.8 ml HBTU-Lösung (mmol) zur nächsten zu koppelnden Aminosäure gegeben und die Harzkügelchen nach dem Trockensaugen wie oben mit konz. TFA behandelt und das in diesem Abschnitt beschriebene Syntheseprotokoll erneut abgearbeitet. Vor der Kopplung der ersten Aminosäure wurde bei der Synthese von Peptiden mit C-terminalen Thioestern die Thiolschutzgruppe abgespalten. Hierfür wurde 3.1 ml Piperidin, 2.3 ml *b*-Mercaptoethanol, sowie 10 ml DMF benötigt und für 20 min reagieren gelassen. Folglich wurde mit DMF gewaschen und das hier beschriebene Syntheseprotokoll durchgeführt.

### 6.2.2.2 Entschützung und Abspaltung der Peptide

Um das Thioesterharz und alle Boc-Schutzgruppen abzuspalten, damit die Peptidsequenzen für den Schritt der nativen chemischen Ligation frei vorliegen bzw. um die gezogenen Proben einem Ninhydrinnachweis unterziehen zu können, wurde *in situ* hergestelltes HF mittels HF-Anlage unter dem Abzug verwendet. Je eine Peptidsequenz wurde mit 10 ml *in situ* hergestelltem wasserfreiem HF und 500 µl *p*-Kresol bei 0°C versetzt und bei dieser Temperatur für 1 h reagieren gelassen (eine Dunkelfärbung war zu beobachten). Anschließend wurde das HF unter reduziertem Druck entfernt, das Rohpeptid in Et<sub>2</sub>O aufgenommen, filtriert und gründlich mit Et<sub>2</sub>O gewaschen und trocken gesaugt. Zuletzt wurde die Peptidsequenz in einer 1 : 1 Mischung Puffer A : Puffer B aufgenommen, im

flüssig-N<sub>2</sub>-Bad eingefroren, anschließend lyophilisiert und im Tiefkühler (vor Feuchtigkeit geschützt, verpackt,) bei -20°C aufbewahrt.

### 6.2.2.3 Aufreinigung der Peptide

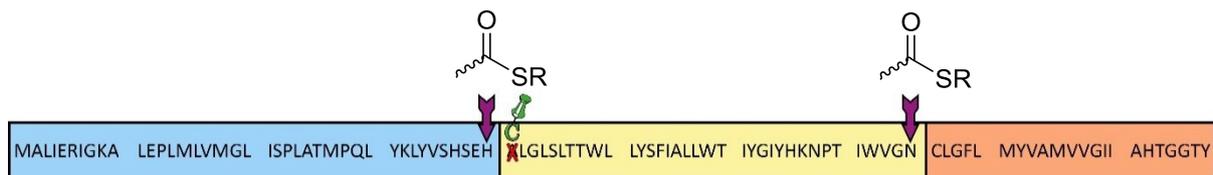
Hierfür wurden die Geräte Varian (6.2.1.1), Waters (6.2.1.2) und Charly (6.2.1.3) verwendet. Technische Daten sind in den entsprechenden Abschnitten nachzulesen. Für die präparative HPLC wurden immer die selbigen zwei Kromasil®-Säulen (C4, **Abschnitt 6.2.1.1**) verwendet, welche nur für die Aufreinigung von Peptiden bestimmt waren, um Verunreinigungen durch Rückstände anderer Verbindungen auf der stationären Phase möglichst gering zu halten. Die Zusammensetzungen der verwendeten Pufferlösungen sind in Abschnitt **6.1.2.5** nachzulesen. Da die Aufreinigung der Peptidsequenzen sich als schwieriger herausstellte, wurden die Aufreinigungsprogramme individuell angepasst und es brauchte mehrere Versuche bis diese optimiert waren. Hierzu wird in Abschnitt **7** genaueres erläutert.

### 6.2.2.4 Native chemische Ligation der Peptide

Um diese Masterarbeit abzurunden, wurden die zwei Ligationsreaktionen, Kopplung von **Seq. 1** mit **Seq. 2** und **Seq. 2** mit **Seq. 3**, durchgeführt. Hierfür wurden 1 - 2 mM des gereinigten Peptids mit C-terminalen  $\alpha$ -Thioester und 1.1 Äquiv. des gereinigten Peptids mit N-terminalen Cys in 6 M Guanidinium Puffer gelöst, mit 300 mM NaPi und 1% Thiophenol, welcher als Katalysator der Reaktion dient und diese startet, bei pH 7.0 versetzt und 24 h bei RT vorsichtig gerührt. Um die Reaktionen abubrechen wurden 3 Äquiv. 6 M Guanidinium, 50 mM Tris (pH 8.6) und 1 Äquiv.  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben und für 1 - 2 h rühren gelassen. Anschließend wurden die Lösungen auf pH 4.0 gebracht und der Erfolg der Kopplungen mittels HPLC, überprüft.

# 7. Ergebnisse

Um das gewünschte Membranprotein des Bakteriums *Vibrio sp.* (**Abbildung 13**) mittels SPPS synthetisch herzustellen, wurde der Proteinstrang in drei Sequenzen (**Seq. 1, Seq. 2, Seq. 3, **Abbildung 10****) untergliedert, welche jeweils nach der Boc-Strategie (wie im Abschnitt **6.2.2.1** angeführt) aufgebaut wurden, die notwendigen synthetischen Modifikationen vorgenommen (**Abbildung 11** und **Abbildung 17**), um nachfolgend zur Gesamtpeptidkette mittels NCL (siehe Abschnitt **6.2.2.4**), gekoppelt zu werden.



**Abbildung 17:** Grafische Darstellung vom Proteinstrang mit farblich gekennzeichneten Gliedern der zu synthetisierenden Peptidsequenzen **Seq. 1** (blau), **Seq. 2** (gelb) und **Seq. 3** (orange) des gewünschten Membranproteins (**Abbildung 13**) mit den nötigen Modifikationen.

Der stückweise Aufbau soll den Erfolg der Synthese maximieren. Kürzere Peptide lassen sich leichter mittels FPPS aufbauen und es fallen statistisch gesehen weniger, kaum vermeidbare, Nebenprodukte an. Des Weiteren stellen sich die Reinigung sowie die Analyse kürzerer Peptide meist als unkomplizierter heraus, nicht nur weil diese meist eine bessere Löslichkeit aufweisen.

## 7.1 Sequenz 1 (Seq. 1)



**Abbildung 18:** Grafische Darstellung der in blau hervorgehobenen 1. Sequenz (**Seq. 1**) der Peptidkette aus **Abbildung 13**, mit ihrer, für die NCL benötigten, Modifikation.

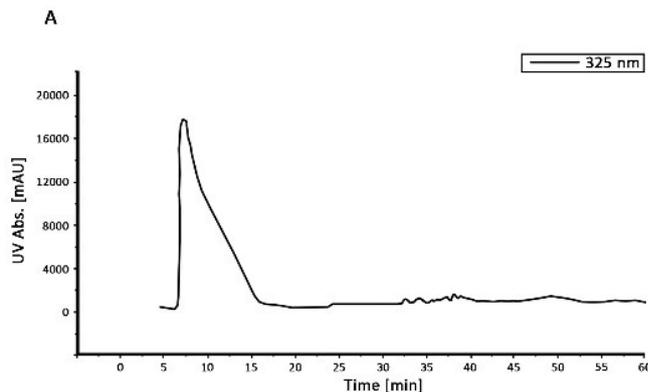
### 7.1.1 FPPS von Seq. 1 mittels Boc-Strategie

Die **Seq. 1**, bestehend aus 40 AS, wurde wie in Abschnitt **6.2.2.1** beschrieben an einem speziellen Thioesterharz, welcher nach der Abspaltung vom Resin einen Thioester am C-Terminus der *alpha*-AS freilegte, von C- nach N-Terminus aufgebaut. Nach der Kopplung von Gln wurde DCM anstelle von DMF als Waschreagenz verwendet. Anschließend wurde dem Syntheseprotokoll laut Abschnitt **6.2.2.1** weiterhin gefolgt und wieder DMF als Waschreagenz verwendet. Zuletzt wurde wie in Abschnitt **6.2.2.2** angeführt, entschützt, vom Resin abgespalten und lyophilisiert.

### 7.1.2 Reinigung von Seq. 1

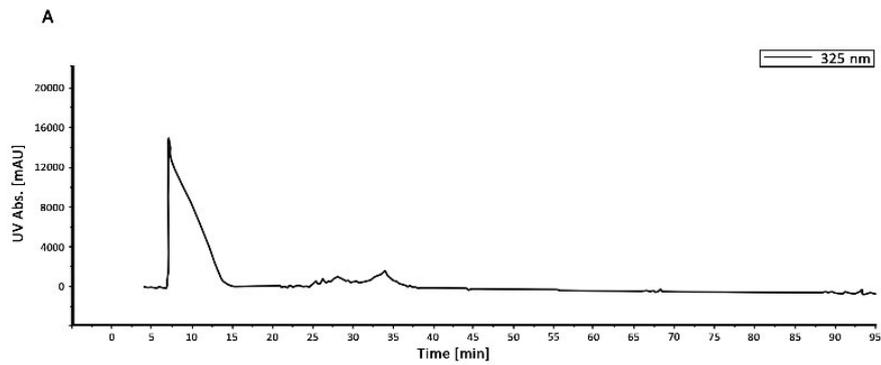
Abschnitt **6.2.2.3** ist ergänzend zu lesen.

Für die Aufreinigung der **Seq. 1** im präparativen Maßstab wurde das lyophilisierte Rohpeptid in möglichst wenig Volumen Puffer D aufgenommen, gelöst und auf die C4 HPLC Säule aufgetragen. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min wurde ein Gradient von 5 - 65% Puffer B innerhalb von 30 min bei 50°C auf dem Varian System (**6.1.1**) durchlaufen. Als gegenübergestellter Puffer wurde Puffer A verwendet. Alle 30 s wurde eine neue Fraktion mittels Autokollektor des Varian Systems (**6.1.1**) gesammelt.



**Abbildung 19** HPLC-Chromatogramm zur präparativen Aufreinigung von **Seq. 1** an der Varian (**6.1.1**) innerhalb 30 min bei 50°C (3 ml/min) mit einem Gradienten von 5% - 65% Puffer B gegen Puffer A mit vorangegangenen 5 min entsalzen.

Aus **Abbildung 19** ist zu entnehmen, dass das Peptid nicht aufgetrennt wurde. Demzufolge wurde überprüft, ob der Gradient zu kurz gewählt wurde, somit das Peptid an der Säule haften blieb, erst beim Nachspülen mitgeschwemmt und dadurch nicht detektiert wurde, oder kurz nach dem Injektionspeak schon eluiert wurde, sozusagen durchgelaufen ist. Vor dem nächsten Lauf wurde mit 100% Puffer B nachgewaschen, gesammelt, lyophilisiert und überprüft, ob **Seq. 1** enthalten ist. Auch der Waste, kurz nach der Injektion, wurde aufgefangen, lyophilisiert und auf **Seq. 1** analysiert. Es stellte sich heraus, dass das Rohpeptid zu schnell eluiert wurde, sodass keine Auftrennung erfolgen konnte und unter dem Buckel des Injektionspeaks die Eluation des unseparierten Peptids versteckt war. Daher wurde als nächster Schritt ein größerer Gradient durchlaufen, 5 - 95% Puffer B gegen Puffer A innerhalb 30 min bei 50°C. Die Probenaufbereitung erfolgte wie oben beschrieben.

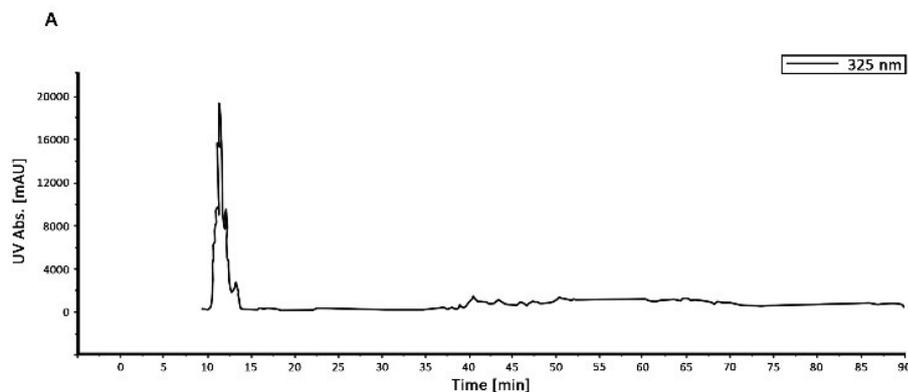


**Abbildung 20** HPLC-Chromatogramm an der Varian (6.1.1) innerhalb 30 min bei 50°C (3 ml/min) mit einem Gradienten von 5 - 95% Puffer B gegen Puffer A und vorangegangenen 10 min Entsalzen.

In **Abbildung 20** ist zu sehen, dass nun das Einspritzen der Probe zwar separat betrachtet werden kann, jedoch keine schöne Auftrennung erfolgte und der Injektionspeak im Verhältnis zum Elutionspeaks recht dominant war. Aufgrund der bisherigen erfolglosen Separierungen, wurde eigens ein angepasstes Aufreinigungsprogramm (10 ml/min) erstellt:

- 10% Puffer D für 10 min bei 50°C
- von 10% auf 40% Puffer B in 10 min
- 40 - 80% Puffer B in 40 min
- 80 - 95% Puffer B in 10 min
- 95% Puffer B für 10 min
- von 95% auf 5% Puffer B in 5 min

Probe wurde für diesen Lauf wie gehabt in möglichst wenig Volumen 6 M Gua\*HCl aufgenommen.



**Abbildung 21** Absorbtionsspektrum des erneuten Aufreinigungsversuches von **Seq. 1** mit neuem, eigens geschriebenem, Reinigungsprogramm am Varian System (6.1.1).

Anhand von **Abbildung 21** ist zu sehen, dass die Aufreinigung immer noch erfolglos war, weshalb einige Gua\*HCl Blanks über die selbige C4-Säule geschickt wurden, um auf Verunreinigungen auf der Säule und Präzession des Varian Systems (**6.1.1**) zu prüfen.

### 7.1.2.1 Problematik

Es wurden drei Gua\*HCl (Puffer D) Negativkontrollen (**NK1**, **NK2**, **NK3**) mit der selbigen semipräparativen C4-Säule gemessen, welche zuvor in Abschnitt **7.1.2** zur bisherigen fehlgeschlagenen Reinigung von **Seq. 1** herangezogen wurde. Hierfür wurde jedes Mal das gleiche Aufreinigungsprogramm 9 ml/min bei 50°C wie folgt,

Entsalzungsstufe

bis zu Minute 20 5% Puffer B laufen lassen

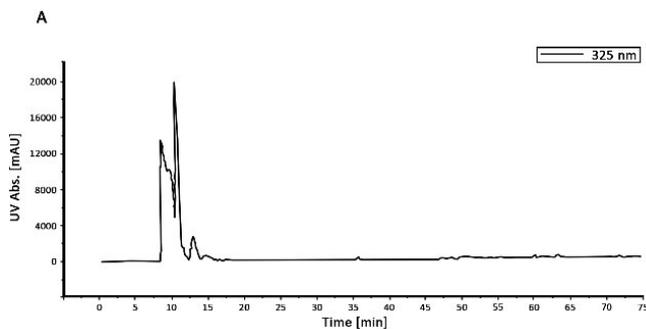
von Minute 20 bis Minute 60 von 5% auf 75% Puffer B steigern

ab Minute 60 bis Minute 65 von 75% auf 85% Puffer B steigern

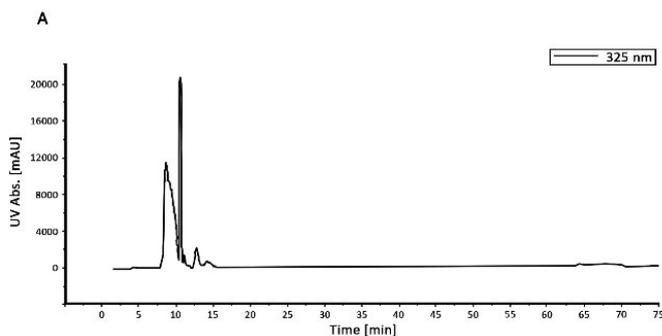
für 5 Minuten bei 85% Puffer B halten

anschließend innerhalb 5 min von 85% auf 5% Puffer B reduzieren

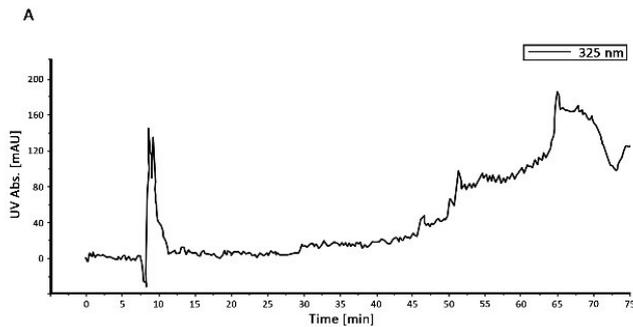
durchlaufen, um die Reinheit der C4-Säule zu überprüfen.



**Abbildung 22** Absorbtionsspektrum am Varian System (**6.1.1**) der ersten Negativkontrolle (**NK1**).

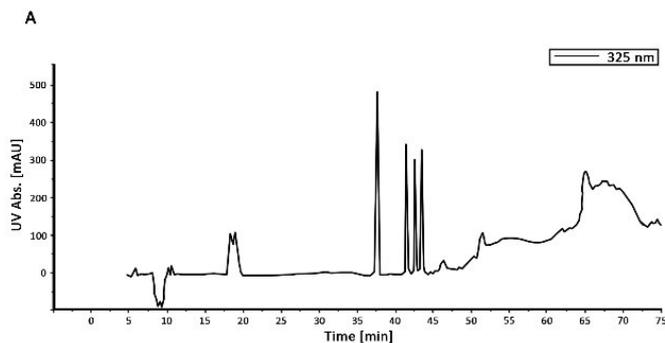


**Abbildung 23** Absorbtionsspektrum am Varian System (**6.1.1**) der zweiten Negativkontrolle (**NK2**).



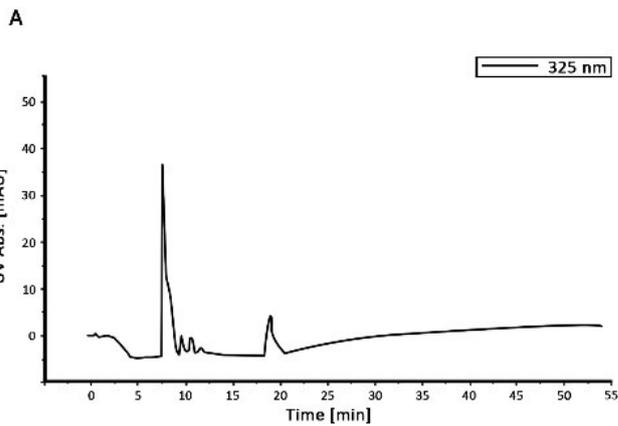
**Abbildung 24** Absorptionsspektrum am Varian System (6.1.1) der dritten Negativkontrolle (NK3). Man beachte, dass hier eine wesentlich geringere Menge eingespritzt wurde, dementsprechend ist die Skalierung mal  $10^{-2}$ , im Vergleich zu den Spektren in **Abbildung 22** und **23**, vom Programm angepasst worden.

Anschließend wurden zwei Durchgänge mit Peptidstandards (HPLC Peptid Standard Mix von Sigma-Aldrich®) unter gleichen Bedingungen durchlaufen, mit dem Unterschied das die Standardproben in  $ddH_2O$  aufgenommen wurden. Mit diesen Versuchen sollte die Präzession des Varian Systems (6.1.1) und die Trennleistung der bislang verwendeten semipräparativen C4-Säule untersucht werden.



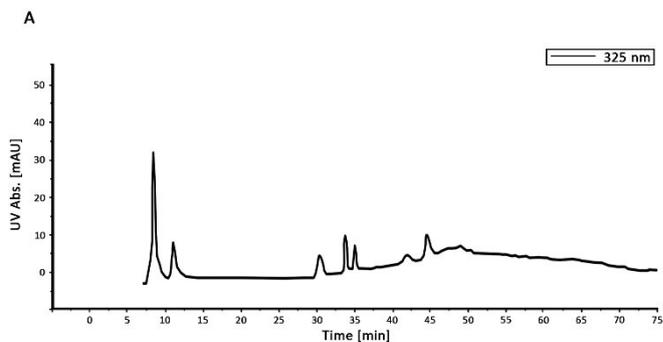
**Abbildung 25** Chromatogramm am Varian System (6.1.1) von 8 Äquiv. Standard in  $ddH_2O$ . Auch hier ist die neue Skalierung zu beachten.

In **Abbildung 25**, dem Absorptionsspektrum von 8 Äquiv. Standard in  $ddH_2O$ , sieht man die korrekte Auftrennung des Standards laut Standardprotokoll. Der Bereich nach Minute 45 ist scheinbar Hintergrund, welcher sich als problematisch herausstellen könnte, wenn die aufzutrennenden Substanzen erst in diesen Bereich chromatografiert werden würden. Der zweite Versuch wurde wie der vorherige allerdings mit 4 Äquvi. Standard durchgeführt, nur das zusätzlich nach der Injektion 10 min gewaschen wurde.



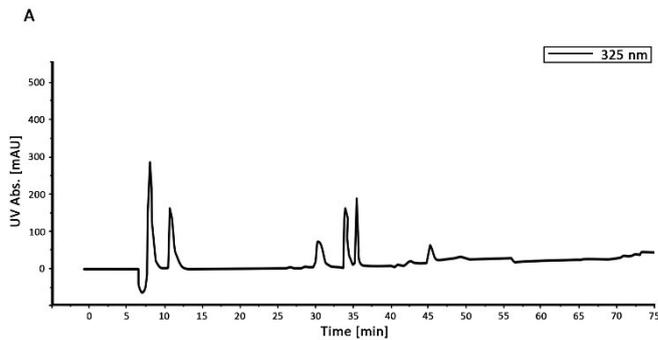
**Abbildung 26** Absorptionsspektrum vom zweiten Standardlauf mit 4 Äquiv. Standard, jedoch mit vermutlich zu niedriger Lampenintensität. Skalierung ist dementsprechend auch zu beachten.

Bei diesem Durchgang (**Abbildung 26**) scheint es, dass die Lampenintensität zu niedrig war, weshalb der Versuch mit 4 Äquiv. wiederholt wurde (siehe **Abbildung 27**).



**Abbildung 27** Absorptionsspektrum vom ersten Wiederholungslauf mit 4 Äquiv. Standard. Skalierung ist dementsprechend auch zu beachten.

Allerdings ist beim ersten Wiederholungsversuch mit 4 Äquiv. Standard (siehe **Abbildung 27**) scheinbar wieder etwas schief gegangen. Es musste hineingezoomt werden, um das Absorptionsspektrum sehen zu können, was an der Skalierung in **Abbildung 27** abzulesen ist. Dies bedeutet, dass die Konzentration der zu trennenden Peptide sehr gering war. Aufgrund dessen wurde dieser Versuch erneut und exakt gleich wiederholt, wie aus **Abbildung 28** zu entnehmen. Was dennoch aus **Abbildung 27** abzulesen ist, dass bereits ab Minute 37 der Hintergrund der Säule sichtbar wurde und somit die Ergebnisse aus **Abbildung 25** bestätigt wurden.



**Abbildung 28** Absorptionsspektrum vom zweiten Wiederholungslauf mit 4 Äquiv. Standard. Skalierung ist dementsprechend zu beachten.

Der zweite Wiederholungsversuch (**Abbildung 28**) zur Auftrennung von 4 Äquiv. Standard mit dem Varian System (**6.1.1**) und der zu überprüfenden semipräparativen C4-Säule ergab, dass die Peptidstandards zwar aufgetrennt werden konnten, allerdings wieder der Hintergrund der C4-Säule sichtbar wurde (ab Minute 40).

Aufgrund dieser Versuchsreihe wurde berechnet:

Verwendetes Reinigungsprogramm steigerte von 5% auf 75% Puffer B innerhalb 40 min. Dies entspricht einem Anstieg von 1.75% Puffer B pro min. Der Hintergrund der Säule war bei den vorangegangenen Versuchen ab Minute 30 mit einer drastischen Steigerung ab Minute 45 in **Abbildung 24**, ab Minute 45 in **Abbildung 25**, ab Minute 37 in **Abbildung 27** und ab Minute 40 in **Abbildung 28**, bemerkbar. Daraus lässt sich im Schnitt schließen, dass diese C4-Säule nur zum Trennen von Peptiden herangezogen werden sollte, welche vor 40% Puffer B eluieren. Des Weiteren war aus dieser Versuchsreihe abzuleiten, dass die Trennleistung dieser Säule ab einem Wert von 23% Puffer B bereits beeinträchtigt sein kann und eine drastische Einbuße an Trennleistung ab einem Prozentsatz von 49% Puffer B eintritt.

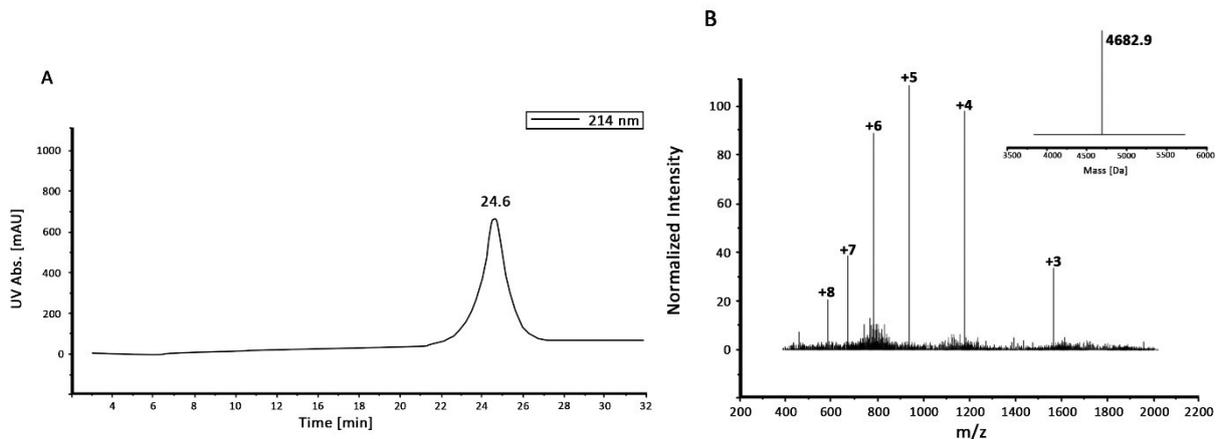
### 7.1.2.2 Optimierung

Aufgrund der Versuchsreihe in Abschnitt **7.1.2.1** und die daraus resultierende Schlussfolgerung, wurde die bisher verwendete semipräparative C4-Säule (Kromasil® 300 - 10 C4 250 x 21.2mm), durch eine andere semipräparative Kromasil® C4-Säule der gleichen Art, ersetzt. Aufgrund der höheren Verluste an Rohpeptid von **Seq. 1** durch die vorangegangene Problematik, war nur mehr genügend Material für eine Chromatografie über die C4-Säule mit kleinerem Durchmesser (Kromasil® 300 - 5 C4 250 x 10mm) vorhanden, oder eine Aufreinigung des gesammelten Wastes aus dem ersten Versuch (Abschnitt **7.1.2**, **Abbildung 19**). Aufgrund der bereits bekannten eher schlechten Separierung von **Seq. 1**, sowie aus Zeitgründen, wurde für einen Lauf über die kleine C4-Säule (3 ml/min, bei 50°C) mit der geringen Menge an Rohpeptid entschieden. Wie der Ausdruck bereits verrät, brächte der Waste eine höhere

Problematik mit sich, da wesentlich mehr Verunreinigungen von der gewünschten Peptidsequenz zu trennen wären, weshalb diese Option erst als letzte Instanz zu wählen blieb.

### 7.1.3 Analyse von Seq. 1

Die Chromatografie über die kleine C4-Säule (Kromasil® 300 - 5 C4 250 x 10 mm) mit Aufbereitung der Probe und dem durchlaufenen Aufreinigungsprogramm laut Abschnitt 7.1.2.1, erbrachte, nach der Analyse am Waters System (6.1.1), ein MS-Spektrum mit guter Reinheit wie in **Abbildung 29** zu sehen und eine gemessene Masse von 4682.9 Da (kalkulierte Masse: 4683.5 Da) der **Seq. 1**. Es wurden 9.12 mg an gereinigter **Seq. 1** erhalten.



**Abbildung 29 A zu B** dazugehöriges HPLC-Chromatogramm der **Seq. 1** nach der chromatografischen Aufreinigung am Varian System (6.1.1) mit einem Peak bei Minute 24.6, **B** LC-MS (Waters System 6.1. 1) von **Seq. 1** nach der chromatografischen Aufreinigung am Varian System (6.1.1), kalkulierte Masse: 4683.5 Da, gemessene Masse: 4682.9 Da.

## 7.2 Sequenz 2 (Seq. 2)



**Abbildung 30** Grafische Darstellung der in gelb hervorgehobenen 2. Sequenz (**Seq. 2**) mit ihren synthetisch vorzunehmenden Modifikationen.

### 7.2.1 FPPS von Seq. 2 mittels Boc-Strategie

Die **Seq. 2**, bestehend aus 35 AS, wurde wie in Abschnitt **6.2.2.1** beschrieben an einem speziellen Thioesterharz, welcher nach der Abspaltung vom Resin einen Thioester am C-Terminus der *alpha*-AS freilegte, von C- nach N-Terminus aufgebaut. Anstelle der letzten Aminosäure, dem Ala, wurde ein Cys gekoppelt, um für die nachfolgende NCL (laut Abschnitt **6.2.2.4**) alle erforderlichen Reaktionsbedingungen zu gewährleisten. Die Entschützung von **Seq. 2** erfolgte vor der Aufreinigung wie in Abschnitt **6.2.2.2** angeführt.

### 7.2.2 Reinigung von Seq. 2

Vor der Säulenchromatografie von **Seq. 2**, wurde diese Sequenz, zusammen mit **Seq. 1** und **Seq. 3** den Löslichkeitsversuchen, wie in Abschnitt **7.4** erläutert, unterzogen, um unter anderem ein geeignetes Laufmittel für die Separierung mittels HPLC (**6.1.1**) zu finden. Der Löslichkeitsversuch für **Seq. 2** ergab, dass dieses im Scheidetrichter durch vorsichtiges Ausschütteln in Puffer C: Puffer A (1 : 1.7) vorgereinigt werden konnte, und somit die Säulenchromatografie erleichtern würde. Das Rohpeptid von **Seq. 2** wurde, wie in Abschnitt **7.4** vorgereinigt, lyophilisiert und wie in Abschnitt **6.2.2.3** erläutert, mit nachfolgendem Reinigungsprogramm 10 ml/min bei 50°C, aufgenommen in Puffer C, am Varian System (**6.1.1**) auf der ausgetauschten semipräparativen C4-Säule (**6.2.1.1**) chromatografiert.

Entsalzungsstufe für 10 min

anschließend für 10 min bei 5% Puffer C laufen lassen

5% auf 75% Puffer C in 80 min steigern

von 75% auf 85% Puffer C innerhalb der nächsten 5 min steigern

für 5 Minuten bei 85% Puffer C halten

anschließend innerhalb 5 min von 85% auf 5% Puffer C reduzieren

### 7.2.2.1 Problematik von Seq. 2

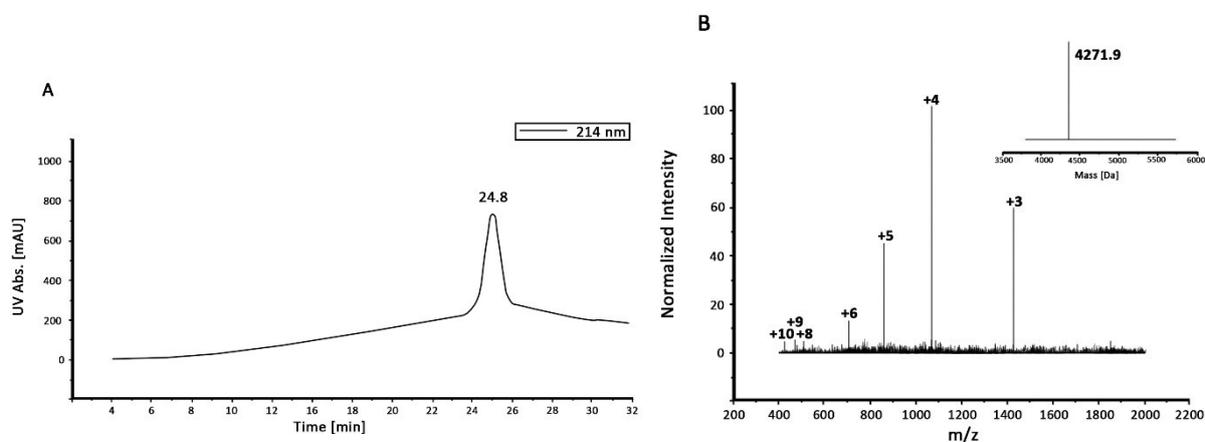
Die **Seq. 2** stellte sich, im direkten Vergleich zu **Seq. 1** und **Seq. 3**, als die unkomplizierteste Sequenz heraus und war von der Synthese, über den Einbau der Modifikationen, bis hin zur Aufreinigung am einfachsten zu handhaben. Eine kleine Anmerkung ist zu erwähnen. Während der SPPS von **Seq. 2**, bereits beim Koppeln der ersten AS, verfärbte sich die Probelösung bei der Behandlung mit TFA von farblos (bis leicht gelb) zu dunkelviolet. Dieser violette Farbton ist auch nach dem Lyophilisieren des Rohpeptides sichtbar, nur wesentlich pastelliger aufgrund des weißen watteartigen Aussehens des Peptides selbst (**Abbildung 34 C**). Dieser Violett-Ton ging beim Ausschütteln mit Puffer C : Puffer A (1 : 1.7), wie in Abschnitt **7.4** beschrieben, verloren, was wiederum für die Vorreinigung per Scheidetrichter spricht.

### 7.2.2.2 Optimierung

Die Vorreinigung von **Seq. 2** per vorsichtigem Ausschütteln, wie in Abschnitt **7.4** beschrieben, stellt nicht nur eine große Ersparnis in Hinsicht auf Zeit und Materialien dar, sondern vereinfacht zusätzlich die darauffolgende Säulenchromatografie. Hierfür wurde die Hälfte an Rohpeptid eingesetzt. Nach der Vorreinigung mittels Scheidetrichter wurden 59,0 mg **Seq. 2** erhalten und für die Aufreinigung per HPLC eingesetzt.

### 7.2.3 Analyse von Seq. 2

Die Chromatografie über die große C4-Säule (Kromasil® 300 - 10 C4 250 x 21.2mm) mit Aufbereitung der Probe sowie dem Aufreinigungsprogramm laut Abschnitt **7.2.2.**, erbrachte, nach der Analyse am Waters System (**6.1.1**), ein MS-Spektrum mit sehr guter Reinheit wie in **Abbildung 31** zu sehen, sowie eine gemessene Masse von 4271.9 Da (kalkulierte Masse: 4271.9 Da) für **Seq. 2**. Von den eingesetzten 59.0 mg vorgereinigter **Seq. 2** wurden 28.7 mg gereinigte **Seq. 2** erhalten.



**Abbildung 31 A zu B** dazugehöriges HPLC-Chromatogramm der **Seq. 2** nach der chromatografischen Aufreinigung am Varian System (**6.1.1**) mit einem Peak bei Minute 24.8, **B** LC-MS (Waters System **6.1.1**) von **Seq. 2** nach der chromatografischen Aufreinigung am Varian System (**6.1.1**), kalkulierte Masse: 4271.9 Da, gemessene Masse: 4271.9 Da.

## 7.3 Sequenz 3 (Seq. 3)



**Abbildung 32** Grafische Darstellung der in orange hervorgehobenen 3. Sequenz (**Seq. 3**) der Peptidkette aus **Abbildung 13**. **Seq. 3** benötigte keinerlei Modifikationen.

### 7.3.1 FPPS von Seq. 3 mittels Boc-Strategie

Die **Seq. 3**, bestehend aus 22 AS, wurde wie in Abschnitt **6.2.2.1** beschrieben an einem Pam-Harz, allerdings von N- nach C-Terminus aufgebaut, um zuletzt bei der Abspaltung (**6.2.2.2**) vom Harz ein ungeschütztes Cys für die NCL (**6.2.2.4**) freizulegen.

### 7.3.2 Reinigung von Seq. 3

Vor der Säulenchromatografie von **Seq. 3**, wurde diese Sequenz, zusammen mit **Seq. 1** und **Seq. 2** den Löslichkeitsversuchen (**7.4**) unterzogen, um unter anderem ein geeignetes Laufmittel für die Separierung mittels HPLC (**6.1.1**) zu finden. Der Löslichkeitsversuch für **Seq. 3** ergab, dass es nur sehr schwer in Lösung ging und dies nur in einer Mischung von ACN : H<sub>2</sub>O (1 : 1 bzw. 7 : 3). Das Rohpeptid von **Seq. 3** wurde, wie in Abschnitt **6.2.2.3** erläutert, mit nachfolgendem Reinigungsprogramm, aufgenommen in möglichst wenig Volumen einer Mischung von ACN : H<sub>2</sub>O (1 : 1 / 7 : 3), am Varian System (**6.1.1**) auf der kleinen semipräparativen C4-Säule (**6.2.1.1**) mit einem Fluss von 3 ml/min bei 50°C chromatografiert.

Entsalzungsstufe für 10 min

anschließend für 10 min bei 5% Puffer B laufen lassen

5% auf 75% Puffer B in 80 min steigern

von 75% auf 85% Puffer B innerhalb den nächsten 5 min steigern

für 5 Minuten bei 85% Puffer B halten

anschließend innerhalb 5 min von 85% auf 5% Puffer B reduzieren

#### 7.3.2.1 Problematik

Aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit von **Seq. 3** bzw. dem Rohpeptid von **Seq. 3**, konnte nur wenig der gewünschten Peptidsequenz in Lösung gebracht werden, dementsprechend auch nur ein recht kleines Volumen des Rohpeptids per HPLC aufgereinigt werden, weshalb die kleine C4-Säule (**6.2.1.1**)

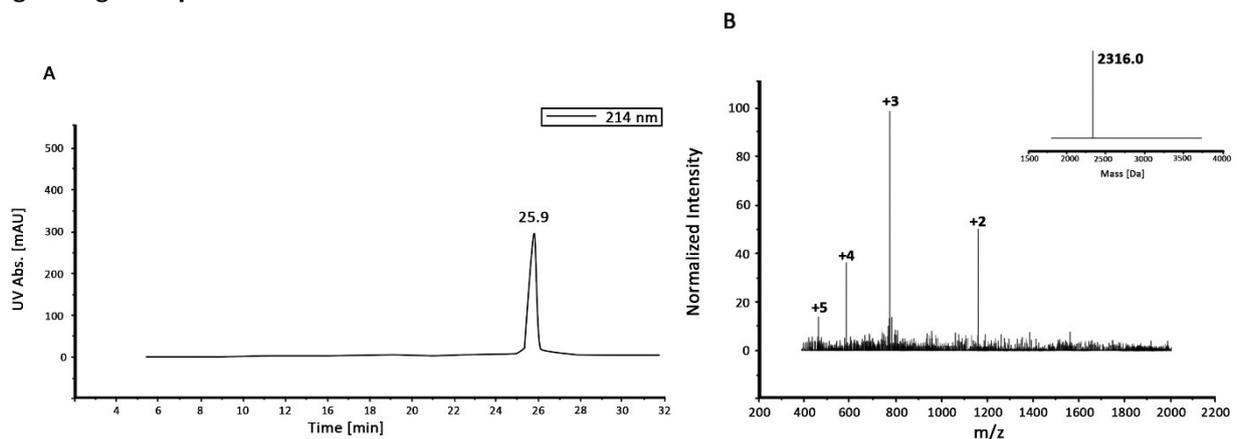
zur Reinigung herangezogen wurde und dementsprechend auch eine sehr kleine Menge an gereinigter **Seq. 3** für die ausstehende NCL zu erwarten war.

### 7.3.2.2 Optimierung

Glücklicherweise konnte die geringe Menge an Rohpeptid von **Seq. 3**, welche sich in einer Mischung von ACN : H<sub>2</sub>O (1 : 1 bzw. 7 : 3) löste, erfolgreich aufgereinigt werden. Ein großer Vorteil in Bezug auf **Seq. 3** wäre, geeignetere Löslichkeitsbedingungen zu finden.

### 7.3.3 Analyse von Seq. 3

Die Chromatografie über die kleine C4-Säule (Kromasil® 300 - 5 C4 250 x 10 mm) mit Aufbereitung der Probe sowie dem Aufreinigungsprogramm laut Abschnitt **7.3.2**, erbrachte, nach der Analyse am Waters System (**6.1.1**), ein MS-Spektrum mit guter Reinheit wie in **Abbildung 37** zu sehen, sowie eine gemessene Masse von 2316.0 Da (kalkulierte Masse: 2316.8 Da) der **Seq. 3**. Es wurden 1.58 mg gereinigte **Seq 3** erhalten.



**Abbildung 33 A zu B** dazugehöriges HPLC-Chromatogramm der **Seq. 3** nach der chromatografischen Aufreinigung am Varian System (**6.1.1**) mit einem Peak bei Minute 25.9, **B** LC-MS (Waters System **6.1.1**) von **Seq.3**, kalkulierte Masse: 2316.8 Da, gemessene Masse: 2316.0 Da.

## 7.4. Löslichkeitsversuche der Seq. 1 - 3 und ihrer Rohpeptide

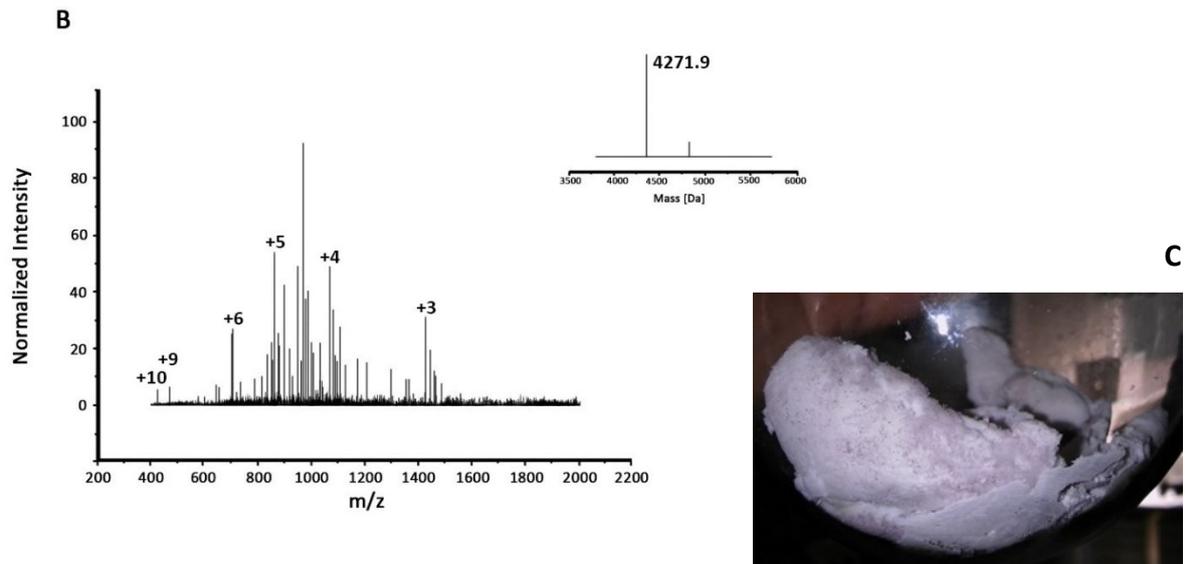
Ein wichtiger Punkt, nicht nur für eine erfolgreiche Aufreinigung mittels HPLC, sondern auch um die erforderlichen Grundbedingungen für die bevorstehende NCL zu schaffen, war es notwendig geeignete Lösungsmittel für die jeweiligen Rohpeptide, sowie für deren gereinigte Formen (**Seq. 1 bis 3**) zu finden. Des Weiteren war es erforderlich, eine Schnittstelle von deren Löslichkeitsbereichen mit denen der Kopplungsreagenzien zu eruieren, welches das Synthesemilieu für die NCL darstellen sollte. Hierfür wurden Löslichkeitsversuche für die jeweiligen Sequenzen (**Seq. 1, Seq. 2 und Seq. 3**), vor und nach ihrer Reinigung per HPLC, durchgeführt. Als Versuchsgefäße wurden kleine HPLC Ampullen (mit 2 ml Fassungsvermögen) gewählt, da diese transparent sind, und somit mit freiem Auge bestimmbar war,

ob Schwebstoffe zu sehen waren, und diese Ampullen [nach kurzem Vortexen (Vortex-Genie 2, **6.1.1**)] direkt in den Autosampler der HPLC-Anlage Charly (**6.1.1**), zur Bestätigung der Solvatisierung per HPLC-Messung (Spektren nicht angeführt), eingeordnet werden konnten. Eine kleine Probe der zu untersuchenden Substanz, wurde mit einem Spatel in eine HPLC-Ampulle überführt und in möglichst wenig Lösungsmittel, per Zutropfen mittels Pipette, bei Raumtemperatur gelöst. Falls ein Volumen von 0.5 ml überschritten werden musste, wurde vor der Zugabe weiterer ml, diese Ampulle einige min bis 2 h stehen gelassen und einstweilen eine der anderen Substanzen untersucht, bzw. zeitgleich die Löslichkeit dieser Substanz in einem weiteren Lösungsmittel überprüft. Als mögliche Lösungsmittel wurden sinnvoll erscheinende herangezogen, welche sich für eine Säulenchromatografie von Peptiden, sowie für die NCL von Peptiden eignen. Hierzu zählen die Pufferlösungen A, B, C und D (siehe **6.1.2.5**), ACN, *ddH*<sub>2</sub>O und Mischungen in unterschiedlichsten Verhältnissen davon. Wie etwas weiter oben erwähnt, wurde, im Falle einer Solvatisation, diese per Esi-LCMS (5 - 65% Puffer B, 3% in der min, 1 ml/ min) am Charly-System (**6.1.1**) bestätigt.

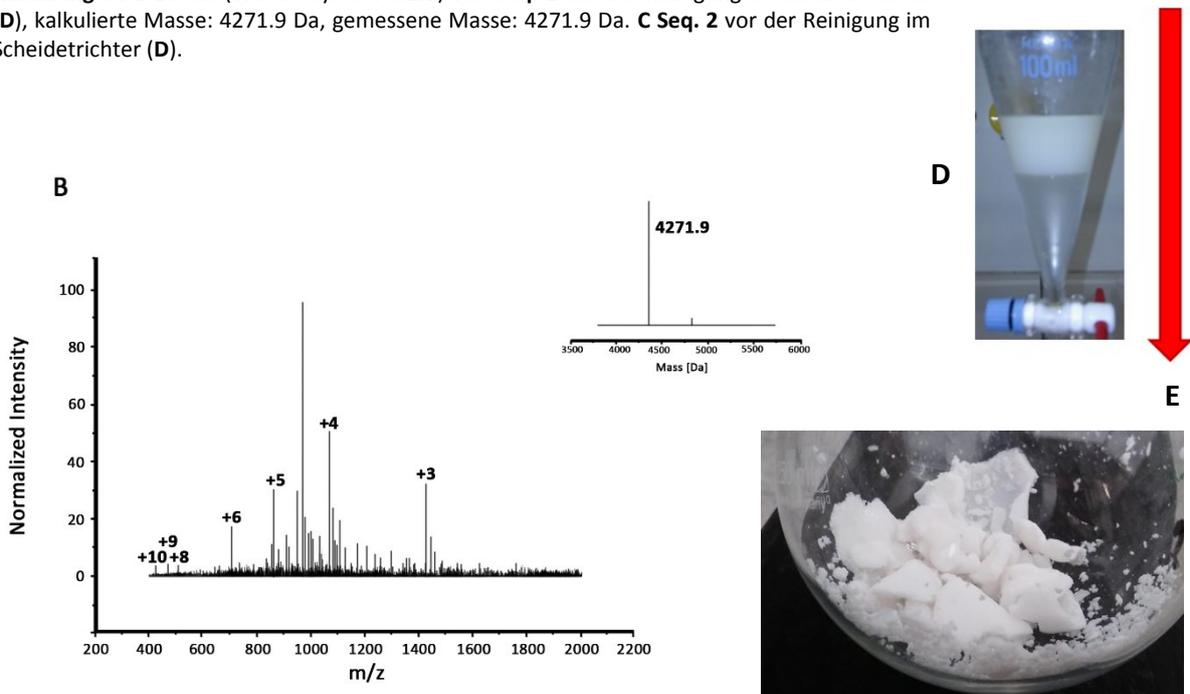
Im Falle von **Seq. 1** und dem dazugehörigen ungereinigtem Rohpeptid, ergab die Versuchsreihe, dass diese sich in 6 M Gua\*HCl (pH 4.6) lösen.

Das Rohpeptid von **Seq. 2** hingegen, tanzte am Flüssigkeitsspiegel von 6 M Gua\*HCl (pH 4.6), bzw. ließ sich nicht in mehr Volumen oder auch nicht nach längerem Warten darin lösen. Es ließ sich ebenso wenig in reinem Puffer A, B oder C lösen. Aufgrund dessen und da bereits eine höhere Menge an Lösungsmittel eingesetzt wurde, wurde die Versuchsreihe für das Rohpeptid von **Seq. 2** in einem kleinen Scheidetrichter (10 ml) weitergeführt. Durch Herumprobieren und sanftes Ausschütteln im Scheidetrichter, wurde herausgefunden, dass **Seq. 2** sich in einer Mischung aus ACN : *ddH*<sub>2</sub>O (4 : 1), sowie in einer Mischung Puffer C : Puffer A (1 : 1.7) löslich ist. Ebenso konnte auf diesem Wege herausgefunden werden, dass **Seq. 2** per sanftem Ausschütteln im Scheidetrichter [mit 6 M Gua\*HCl (pH 4.6) und ACN : *ddH*<sub>2</sub>O (4 : 1) oder 6 M Gua\*HCl (pH 4.6) und Puffer C : Puffer A (1 : 1.7)] vorgereinigt werden kann. Beim Vergleich der MS-Spektren vom Rohpeptid der **Seq. 2** am Waters System (**6.1.1**) von **Abbildung 34** (**Seq. 2** vor der Vorreinigung) mit **Abbildung 35** (nach der Separierung im Scheidetrichter), ist zu erkennen dass sich weniger Nebenprodukte von **Seq. 2** in der Mischung Puffer C : Puffer A (1 : 1.7) lösten, als in der ACN : *ddH*<sub>2</sub>O (4 : 1) Mischung.

Das Rohpeptid von **Seq. 3** bzw. auch die gereinigte Sequenz (**Seq. 3**), stellte sich als wesentlich



**Abbildung 34 B** LC-MS (Waters System 6.1.1) von **Seq. 2** vor der Reinigung im Scheidetrichter (**D**), kalkulierte Masse: 4271.9 Da, gemessene Masse: 4271.9 Da. **C** **Seq. 2** vor der Reinigung im Scheidetrichter (**D**).



**Abbildung 35 B** LC-MS (Waters System 6.1.1) von **Seq. 2** nach der Reinigung im Scheidetrichter, kalkulierte Masse: 4271.9 Da, gemessene Masse: 4271.9 Da. **E** **Seq. 2** nach der Reinigung im Scheidetrichter.

schwerer löslich dar als die anderen synthetisierten Sequenzen. Hier führten die Löslichkeitsversuche zu dem Schluss, dass die **Seq. 3** nur in einer Mischung von ACN : H<sub>2</sub>O (1 : 1 bzw. 7 : 3) löslich ist und hierin auch nur recht schlecht.

## 7.4.1 Problematik

Aufgrund der schlechten Löslichkeit von **Seq. 3** konnte hier nur mit äußerst geringen gereinigten Mengen weitergearbeitet werden.

## 7.4.2 Lösungsansätze

Es wäre von Vorteil ein geeigneteres Lösungsmittel für **Seq. 3** zu finden, oder alternative Manipulationen vorzunehmen, um diese Sequenz in Lösung bringen zu können. Hierfür könnten außer der Wahl an Lösungsmittelzusammensetzung, wie einem geringen Zusatz an DMSO (Dimethylsulfoxid) beizumengen, auch Detergenzien [SDS (Sodiumdodecylsulfat) (E. Bianchi, 1999), OG (octylglykosid) (E. Bianchi, 1999), (G. G. Kochendoerfer, 2004), (D. Clayton, 2004), (F. I. Valiyaveetil, 2006), (C. F. Becker, 2011), (Y. Ashina, 2013), DPC (Dodecylphosphocholin) (C. F. Becker, 2011), (Y. Ashina, 2013), (D. Clayton, 2004), (F. I. Valiyaveetil, 2006), (G. G. Kochendoerfer, 2004), ] oder sogenannte solubilizing tags [Arg-tag (Polyarginin), PEG (Polyethylenglykol)] eingesetzt werden. Die schlechte Löslichkeit von Membranproteinen und Transmembranpeptiden lässt sich auf den hohen Anteil an unpolaren Aminosäureresten zurückführen. (C. F. W. Becker, 2005) Um dies zu überwinden können hydrophile funktionelle Gruppen eingebracht werden, welche als solubilizing tags des jeweiligen Peptides bezeichnet werden. Hierbei können die solubilizing tags permanent an den N- (E. Bianchi, 1999) oder C-Terminus (C. F. W. Becker, 2004), (T. Sato, 2005), (P. W. Harris, 2010), (M. Paradís-Bas, 2015), (E. C. B. Johnson, 2007), (S. Chemuru, 2014) geknüpft werden, oder an Aminosäureseitenketten, wie Serin oder Threonin (Z. Tan, 2011), (Y. C. Huang, 2013), (M. T. Jacobsen, 2016), (S. K. Maity, 2016). Zu beachten ist jedoch, dass solche permanenten Ergänzungen in der Struktur, die biologischen Eigenschaften von Proteinen beeinflussen könnten. Um diesen Nachteil zu umgehen, können stattdessen temporäre solubilizing tags verwendet werden. Eine Möglichkeit, welche vor allem auch bei der Synthese des SemiSWEET-Transporters aus dem Bakterium *Vibrio sp.* von Interesse wäre, wäre das Einbringen temporärer solubilizing tags in die Thioester-Abgangsgruppe, welche während der NCL verloren gehen würde. Hierzu wurde bereits 2004 bei der Synthese des HIV-1 Virusproteins u (Vpu) ein Poly(ethylenglykol)polyamid-Tag (PPO) in die Thioester-Abgangsgruppe eingebaut. (C. F. W. Becker, 2004) Ein weiteres solubilizing tag dieser Klasse ist der Thioester-poly-Arg-Tag (T. Sato, 2005), welcher bei der Synthese der Diacylglycerolkinase (DAGK) verwendet wurde. (C. F. Becker, 2011) Bei dieser Art an Tags ist zu berücksichtigen, dass sie bei der NCL als Abgangsgruppe verloren gehen und bei der Formierung des Ligationsprodukts nicht beteiligt sind. Des Weiteren wurden bereits basenlabile (P. W. Harris, 2010), säurelabile (M. Paradís-Bas, 2015) und enzymesensitive (E. C. B. Johnson, 2007) Linker entwickelt, welche als temporäre Tags an den C-Terminus geknüpft werden können. Diese müssen allerdings unter spezifischen Bedingungen entfernt werden. Es existieren bereits Arbeiten zur Verwendung von temporären solubilizing tags für Aminosäureseitenketten, wie Glu, Lys, Thr und Cys. (Z. Tan, 2011), (Y. C. Huang, 2013), (M. T. Jacobsen, 2016), (S. K. Maity, 2016) Auch photolabile temporäre solubilizing tags finden ihren Einsatz, wie zum Beispiel bei der Synthese des Lipoproteins 1A/1B-light chain 3 (LC3-II), einem autophagosomalem Proteinmaker, welcher an Fusions- und

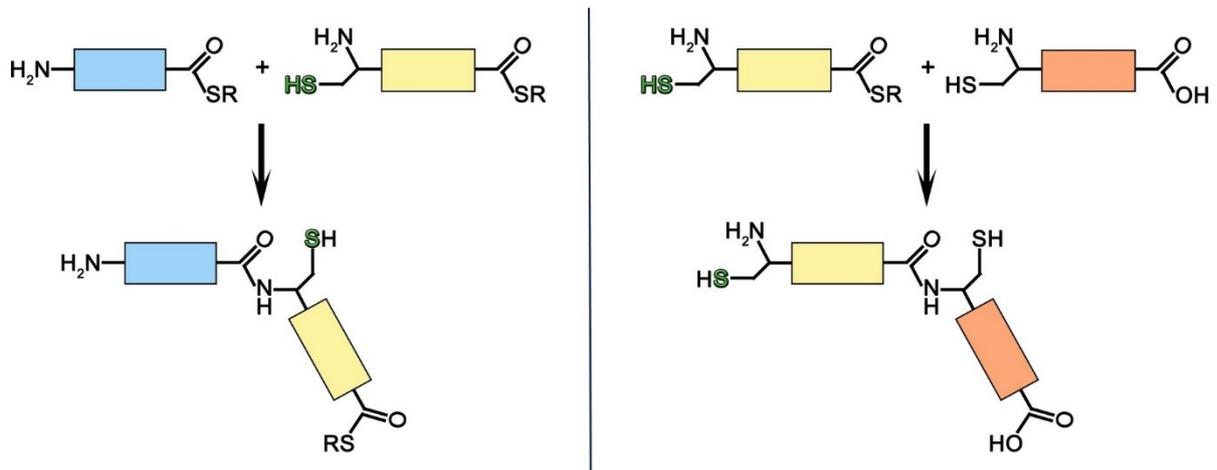
Expansionsprozessen in der autophagosomen Membran beteiligt ist. Hierbei werden die Tags temporär an Gln Seitenketten gekoppelt. (Y. C. Huang, 2013) Neben den solubilizing tags können auch *O*-Acyl-Isopeptid-Einheiten in das Peptidrückgrat eingebracht werden, um die Löslichkeit von Transmembranpeptiden zu erhöhen. Hierbei verhindert die temporär eingebrachte Ester-Bindung die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen des Amids am Peptidgrundgerüst, wodurch die Aggregation des Peptides und die Ausbildung sekundärer Strukturen verhindert werden. (Y. Sohma, 2004) Die Ausbildung sekundärer Strukturen von Transmembranpeptiden ist ein weiterer Grund für ihre geringe Löslichkeit. (J.-B. Li, 2017) Um die Ausbildung von inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen in Sekundärstrukturen zu unterbinden, können auch irreversible Modifikationen am Grundgerüst des Peptids vorgenommen werden. Das Maskieren des H-Atoms am  $N_{\alpha}$  des Amids, durch N-Methylierung oder Prolin-Substitution, zeigte eine signifikante Zunahme in der Löslichkeit von Transmembranpeptiden. (E. C. B. Johnson, 2006) Zu beachten ist hier, dass die Veränderungen in der Struktur irreversibel sind.

Die hier beschriebenen Möglichkeiten, um die Löslichkeit von Membranproteinen und Transmembranpeptiden zu erhöhen, werden nicht nur für die Handhabung und Aufreinigung dieser genutzt, sondern auch für ihre NCL. (C. F. W. Becker, 2004), (G. G. Kochendoerfer, 2004), (C. F. Becker, 2011)

Ein weiterer möglicher Lösungsansatz wäre, während der chromatographischen Aufreinigung der Sequenzabschnitte fluorierte organische Lösungsmittel einzusetzen. Die Überlegung dahinter ist, dass die Fluoratome mit den Wasserstoffbrückenbindungen der Sekundärstrukturen konkurrieren, diese schwächen oder möglicherweise gar selbst Fluor-Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, somit die Peptidsequenzen besser in Lösung gehen und folglich besser aufgereinigt werden könnten. (J.-B. Li, 2017) Hierzu wird vom Einsatz fluorierte Alkohole, wie HFIP (Hexafluoroisopropanol), TFE (Trifluorethanol) und PhTFE (Phenyltrifluorethanol) berichtet. (A. Berkessel, 2006), (N. H. Andersen, 1999) Ebenso wird TFE nachgesagt, dass es  $\alpha$ -helices stabilisiert (G. Ebert, 1983) und nur zu einem sehr geringen Anteil  $\beta$ -helices. (K. P. Fears, 2014)

## 7.5 Kopplungsversuche mittels NCL

Die **Seq. 1** wurde mit **Seq. 2**, sowie die **Seq. 2** mit **Seq. 3**, mittels NCL, wie in Abschnitt **6.2.2.4** beschrieben, gekoppelt (siehe **Abbildung 36**).



**Abbildung 36** Schematische Darstellung der durchgeführten NCL von **Seq. 1** (blau) mit **Seq. 2** (gelb), sowie von **Seq. 2** (gelb) mit **Seq. 3** (orange).

Hierbei wurde 6M Guanidiniumpuffer als chaotropes Reagenz eingesetzt, da es die Entfaltung der Peptide unterstützt und somit funktionelle Gruppen zugänglicher macht. Thiophenol nahm bei der NCL die Rolle des Katalysators ein und leitete somit den Start der Kopplung ein. Thiophenol reagiert während der Umesterungsreaktion mit dem Thioester und bildet einen Thiophenolester, welcher eine bessere Abgangsgruppe darstellt und den Angriff des Cysteins erleichtert (**Abbildung 9**). In Folge dessen bildet sich eine Amidbindung aus. Für den Abbruch der NCL wurde eine Mischung aus 6 M Guanidiniumpuffer, 50 mM Tris (pH 8.6) und  $\beta$ -Mercaptoethanol verwendet. Vor der Analyse per HPLC wurde die Probelösung auf pH 4 eingestellt.

## 7.5.1 Analyse des Polypeptidstrangs nach Kopplung

Die Analyse mittels HPLC am Charly System (**6.2.1.3**) ist ohne Befund (Daten sind nicht angeführt). Es konnte kein Signal vom Rauschen unterschieden werden. Demzufolge ist von einer Zersetzung auszugehen, da auch keine Signale der Ausgangsmaterialien zu sehen waren. Neben der Zersetzungstheorie bestünde noch die Möglichkeit, dass die Ligationsprodukte sich an der Glaswand der HPLC-Ampullen abgeschieden haben und sich somit der Analysemessung entzogen haben. Letztere Theorie wurde jedoch zu spät aufgestellt, um dem noch nachgehen zu können. Demzufolge sollten die Versuche der NCL wiederholt werden. Idealerweise unter optimierten Bedingungen wie in Abschnitt **7.4.2** und **7.5.2** diskutiert.

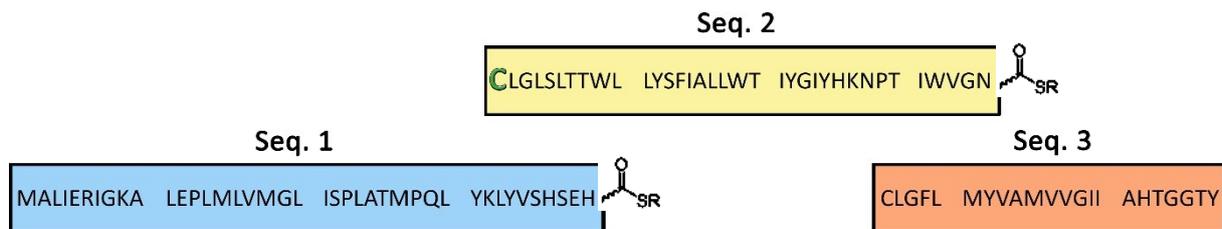
## 7.5.2 Problematik und Lösungsansätze für die NCL

Die größten Herausforderungen bei der NCL von Membranproteinen setzen sich aus ihrer eher schwierigen Handhabung zusammen, welche wiederum von der geringen Löslichkeit der Transmembranpeptide hervorgehen. (C. F. W. Becker, 2005), (C. F. Becker, 2008), (C. Zuo, 2016) Wie bereits in Abschnitt **7.4.2** beschrieben, gibt es mittlerweile einige Ansätze, um die Löslichkeit und die

Handhabung von Transmembranpeptiden und Membranproteinen während der NCL zu optimieren und ihre anschließende Charakterisierung zu erleichtern. Neben den bereits genannten Methoden (Abschnitt 7.4.2), gibt es noch die Option wiederentfernbarer Rückgratmodifikationen [removable backbone modification (RBM)] an den Peptidsegmenten vorzunehmen, um ihre gegenläufigen Eigenschaften zu überwinden. (J.-B. Li, 2017) Dabei werden die RBM-Einheiten als solubilizing tags eingesetzt. Sie werden *via O-zu-N Acyl-Transfer* an primären Aminosäuren der Transmembranpeptide geknüpft und sind mittels TFA-Cocktail entfernbar. (J.-B. Li, 2017) Diese Methode ist jedoch nicht anwendbar bei der Synthese von Transmembranpeptiden mittels Boc-SPPS, da die RBM-Einheiten die TFA-Behandlung während der Boc-SPPS nicht standhalten. Somit wäre diese Technik erst anschließend an die Synthese möglich, aber auf jeden Fall bei Synthesen von Transmembranpeptiden mittels Fmoc-SPPS in Erwägung zu ziehen. Bei der NCL von **Seq. 1** mit **Seq. 2** und **Seq. 2** mit **Seq. 3**, um das Polypeptid aus dem Bakterium *Vibrio sp.* zu erhalten, gab es zwei Hauptprobleme. Einerseits ging **Seq. 3** nur zu einem sehr geringen Anteil in Lösung, weshalb für die NCL von **Seq. 2** mit **Seq. 3** (7.5), **Seq. 3** der limitierende Faktor war. Andererseits ist das gewählte Lösungsmittel der NCLs, 6 M Guanidinium Puffer, ungeeignet, da sich die mittlere Sequenz (**Seq. 2**), wie in Abschnitt 7.4 erläutert, nicht bzw. nur zu einem äußerst geringen Anteil darin löslich ist. Somit stellt sich 6 M Guanidinium Puffer unter diesen Bedingungen als ungeeignetes Medium für die NCLs (7.5) des SemiSWEET-Transporters des Bakteriums *Vibrio sp.* dar. Es sei denn, man nimmt Modifikationen an den Peptidsequenzen vor, wie sie in Abschnitt 7.4.2 und 7.5.2 diskutiert wurden.

## 8. Zusammenfassung & Schlussfolgerung

Es wurde der Peptidstrang *Vibrio sp.* in 3 Abschnitten mittels SPPS nach der Boc-Strategie synthetisiert und mittels *in situ* erzeugtes HF vom Resin abgetrennt und entschützt. Die SPPS Synthesen mittels Boc-Strategie liefen von der Handhabung her für jede der Sequenzen (**Seq. 1**, **Seq. 2** und **Seq. 3**) ohne erkennbare Probleme ab. Der Einbau der, für die Kopplung zum Gesamtpeptidstrang *via* NCL nötigen, Modifikationen während der Synthese der Peptide, sowie ihre Entschützung, lief ebenso reibungslos ab.



**Abbildung 37** Schematische Darstellung der Bausteine für die bevorstehende Kopplung zum Gesamtpeptidstrang *via* NCL. Die Sequenzabschnitte 1 bis 3 [**Seq. 1** (blau), **Seq. 2** (gelb) und **Seq. 3** (orange)] und ihre erfolgreich eingebauten Modifikationen (Thioesterreste und Cys (grün) anstelle von Ala).

Die Aufreinigung der einzelnen Peptidsegmente erwies sich als herausfordernd, da der hohe Anteil an hydrophoben Abschnitten in den Peptiden (C. F. Becker, 2008) und ein recht großer Anteil an Synthesenebenprodukten die Handhabung und Säulenchromatografie erschwerten. Für jeden Sequenzabschnitt wurde ein individuelles, geeignetes, HPLC-Trennungsprogramm gesucht. Hierfür waren mehrere Anläufe notwendig, siehe Abschnitt 7.1.2 und 7.1.2.1. Die Trennungsprogramme, welche die besten Ergebnisse lieferten, waren für **Seq. 1** 10% Puffer C für 10 min bei 50 °C, weiter von 10% auf 40% Puffer B in 10 min, anschließend 40 - 80% Puffer B in 40 min, gefolgt von 80 - 95% Puffer B in 10 min, zuletzt noch 95% Puffer B für 10 min und von 95% auf 5% Puffer B in 5 min. Die Probe wurde für diesen Lauf wie gehabt in 6 M Gua\*HCl (Puffer D) aufgenommen. Für die **Seq. 2** und **Seq. 3** stellte sich die selbige Methode als die geeignetste heraus, jedoch im Falle von **Seq. 2** wurde Puffer B gegen Puffer C getauscht und über die große C4-Säule (6.2.1.1) gereinigt. Ein großer Vorteil wäre gewesen, eine eigene präparative Säule zur Verfügung zu haben, die rein für die Reinigung dieser Sequenzen herangezogen werden würde, da aufgrund des eher höheren Anteils an Synthesenebenprodukten und schlechteren Löslichkeit der Peptide, vor allem betreffend **Seq. 3**, mit kleinen Ausbeuten gearbeitet wurde und Verunreinigungen, durch vorangegangene Auftrennungen anderer Peptide, welche selbst nach mehrmaligem Durchlaufen des angepassten Reinigungsprogrammes, zu Kontaminationen führen konnten oder gar die Zielpeptide überlagern konnten. Des Weiteren ist darauf zu achten, dass die Säulenlänge ausreichend ist. Im Falle von **Seq. 1** wäre eine längere Chromatographiesäule in Betracht zu ziehen, da sich **Seq. 1** schwer von ihren

Nebenprodukten und Verunreinigungen trennen ließ. Mehrfaches Säulen von **Seq. 1** war erforderlich, um zumindest 9.12 mg reine **Seq.1** zu erhalten. Durch jeden Aufreinigungsschritt geht ein gewisser Anteil an Ausbeute verloren. Vor der präparativen Reinigung der Sequenzen 2 und 3 wurden die Löslichkeitsversuche (**7.4**) vorgezogen. Hierbei stellte sich heraus, dass **Seq. 2** im Scheidetrichter vorgereinigt werden konnte, da es nicht in 6M Gua\*HCl (pH 4.6) aber in ACN : H<sub>2</sub>O (4 : 1) löslich war. Nach Separierung der Phasen und Lyophilisierung der Acetonitrilphase, erschien das Rohpeptid als weiße Watte, im Gegensatz zum vorherigen Erscheinungsbild, welches rosa-violetter Watte glich. Die präparative Säulenchromatografie des vorgereinigten Rohpeptids von **Seq. 2**, erschloss sich als unproblematischer, im Vergleich zu **Seq. 1** und **Seq. 3**. Weiteres stellte sich heraus, dass **Seq. 2** auch in einer Mischung von Puffer C : Puffer A (1 : 1.7) löslich war, worin sich sogar weniger Verunreinigungen lösten als in der Acetonitril-Wasser-Mischung (Vergleich **Abbildung 34** mit **35**). Die letzte und kürzeste der drei Sequenzen, **Seq. 3**, war überraschender Weise am schlechtesten löslich, nämlich nur sehr gering in einer ACN : H<sub>2</sub>O Mischung mit einer Zusammensetzung von 1 : 1 und 7 : 3. Auf Grund der damit verbundenen geringeren, in Lösung gegangenen, Probenmenge wurde hier für die präparative Aufreinigung gleich auf die kleinere C4-Säule gewechselt und nur mit einem Fluss von 3 ml/min chromatografiert. Aufgrund dessen war die Ausbeute an **Seq. 3** dementsprechend gering (1.58 mg) und somit die begrenzende Komponente für die nachfolgende NCL. Zusätzlich ist die Zeitspanne nach der Auftrennung bis hin zur Analyse bei allein drei Sequenzen möglichst kurz zu halten, da diese recht empfindlich waren und sich selbst bei Lagerung im Lösungsmittel bei 9 °C über 42 h zersetzten. Zeitmanagement war dabei das Um und Auf.

Nicht nur für den Erfolg der Aufreinigung mittels HPLC, sondern auch für die schlussendliche NCL war es notwendig geeignete Lösungsmittelzusammensetzungen für jeden einzelnen Sequenzabschnitt zu finden. Hierfür wurden Löslichkeitsversuche, wie zuvor bereits erwähnt, für die Sequenzen 1 bis 3 durchgeführt, siehe Abschnitt **7.4**. Diese Versuche ergaben, dass sich **Seq. 1** am besten in 6M Gua\*HCl (pH 4.6) löste, für **Seq. 2** 6 M Gua\*HCl (pH 4.6) komplett ungeeignet als Lösungsmittel war, hingegen eine Mischung von ACN : H<sub>2</sub>O (4 : 1) aber auch eine Mischung von Puffer C : Puffer A (1 : 1.7) sich als ideal erwies. **Seq. 3** stellte sich als besonders schwierig heraus, da es in allen erdenklichen Konstellationen (Abschnitt **7.4**), von sinnvoll erscheinenden Lösungsmittelzusammenstellungen, unlöslich war und sich nur recht schlecht in ACN : H<sub>2</sub>O (1 : 1 bzw. 7 : 3) lösen ließ, was für die nachfolgenden Schritte, die Aufreinigung und die NCL, ein großes Hindernis darstellte. Es kann durchaus sein, dass nicht die eigentliche **Seq. 3** an sich so schlecht löslich ist, sondern die vielen Synthesenebenprodukte die Löslichkeit stark herabsetzten. Jedoch kann eine erfolgreiche Separierung nicht stattfinden, ohne geeignetem Medium, worin sich **Seq. 3** löst und sich für die Säulenchromatografie eignet. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von **Seq. 3** wurde in diesem Fall mit

recht geringen Ausbeuten weitergearbeitet. Zusammenfassend ist zu sagen, dass **Seq. 1** zweifach gekoppelt am Varian System (**6.1.1**) chromatografiert und anschließend mit MS Analyse am Waters System (**6.1.1**) identifiziert wurde, und dieser der Sequenzabschnitt war, welcher sich am schwersten von seinen Synthesenebenprodukten trennen ließ. **Seq. 2** wurde nach der Vorreinigung im Scheidetrichter (Mehr dazu in Abschnitt **7.4.**), gefolgt von der präparativen Chromatografie am Varian System (**6.1.1**), mittels MS am Waters System (**6.1.1**) identifiziert und stellte sich als der unkomplizierteste Sequenzabschnitt heraus. **Seq. 3** war der am schlechtesten in Lösung zu bringende Peptidfragment, wurde daher gleich auf der kleinen präparativen C4-Säule am Varian System (**6.1.1**) gereinigt und anschließend am Waters System (**6.1.1**) mittels MS analysiert. **Seq. 1**, **Seq. 2** und **Seq. 3**, welche in späterer Folge gekoppelt das Membranprotein des Bakteriums *Vibrio sp.* formen sollen, wurden erfolgreich mittels Boc-SPPS und ihren eingebauten Modifikationen (**Abbildung 37**) synthetisiert.

Für die Vollständigkeit dieser Arbeit wurden Kopplungsversuche mittels NCL, siehe auch **7.5**, wie in Abschnitt **6.2.2.4** beschrieben, durchgeführt. Bei der NCL von **Seq. 1** mit **Seq. 2** und **Seq. 2** mit **Seq. 3** (siehe **Abbildung 36**), um das Polypeptid aus dem Bakterium *Vibrio sp.* zu erhalten, gab es zwei Hauptprobleme. Zuerst hätte eine Lösungsmittelzusammensetzung gefunden werden müssen, worin sich die zu koppelnden Peptidsequenzen und die Kopplungsreagenzien lösen ohne sich zu zersetzen. Da dieses Masterpraktikum bereits am Ende angelangt war, wurden aus Zeitgründen nicht mehr unterschiedlichste Medienzusammensetzungen ausgetestet, sondern Ligationsbedingungen (6M Guanidinium Puffer, 300 mM NaPi, 1% Thiophenol (=Katalysator), pH = 7.0, 24 h, RT) gewählt, welche bereits in vorangegangenen Arbeiten (G. G. Kochendoerfer, 1999), (C. F. W. Becker, 2005), (C. F. W. Becker, 2001) zu guten Erfolgen führten (siehe Abschnitt **6.2.2.4**). **Seq 2** löste sich in dem gewählten Kopplungsmedium (6 M Guanidinium Puffer) nicht beziehungsweise nur zu einem zu geringen Anteil, wie in Abschnitt **7.4** berichtet. Demnach stellte sich 6 M Guanidinium Puffer ungeeignet als Hauptmediumbestandteil für die NCLs (**7.5**) der **Seq. 1** bis **3** dar. Wenn hingegen Modifikationen, wie in Abschnitt **7.4.2** und **7.5.2** diskutiert wurde, an **Seq. 2** eingebracht würden, welche die Löslichkeit dieses Peptids in Guanidinium Puffer erhöhen, könnte dieses Hindernis somit überwunden werden. Hierbei ist vor allem an das Einbringen von solubilizing tags zu denken, wie bereits in der Einleitung (**5.2**) am Beispiel der Totalsynthese des Influenza B M2 Protonenkanals {BM2 (1-51)} (A. A. Tietze, 2018) und im Abschnitt **7.4.2**, sowie **7.5.2** vorgestellt wurde. Bei der Synthese des SemiSWEET Transporters wäre der Einbau temporärer solubilizing tags in die Thioester-Abgangsgruppe, welche während der NCL verloren gehen würde, von besonderem Interesse. Bereits 2004 kam bei der Synthese des HIV-1 Virusproteins u (Vpu) ein Poly(ethylenglykol)polyamid-Tag (PPO), eingefügt in die Thioester Abgangsgruppe, zum Einsatz. (C. F. W. Becker, 2004) Neben permanenten und temporären

solubilizing tags, gibt es noch die Möglichkeit Änderungen am Rückgrat des Peptids [removable backbone modification (RBM)] vorzunehmen und somit ihre Löslichkeit zu erhöhen. (J.-B. Li, 2017) Da diese jedoch mit einem TFA Cocktail entfernbar sind, wäre diese Methode nicht bei der Synthese von Transmembranpeptiden mittels Boc-SPPS einsetzbar, hingegen bei der Fmoc-SPPS sehrwohl (mehr dazu in Abschnitt 7.5.2). Ein weiterer Angriffspunkt, um die Lipophilie der Peptidfragmente in den Griff zu bekommen, wäre der Zusatz von Detergenzien, wie SDS (Sodiumdodecylsulfat) (E. Bianchi, 1999) und weiteren, welche in Abschnitt 7.4.2 nachgelesen werden können. Das zweite große Problem stellte **Seq. 3** dar, weil diese nur zu einem sehr geringen Anteil in Lösung ging. Demzufolge konnte für die NCL von **Seq. 2** mit **Seq. 3** (7.5), nur eine äußerst geringe Menge an **Seq. 3** eingesetzt werden. Um die Löslichkeitsprobleme dieser Sequenz zu überwinden, sind die weiter oben genannten Lösungsansätze ebenso in Betracht zu ziehen, welche ausführlicher in Abschnitt 7.4.2 diskutiert werden. Ein weiterer möglicher Lösungsansatz wäre noch, während der chromatographischen Aufreinigung der Sequenzabschnitte fluoridhaltige organische Lösungsmittel einzusetzen. Hierbei konkurrieren die Fluoratome mit den Wasserstoffbrückenbindungen der Sekundärstrukturen. Somit können die Peptidsequenzen besser in Lösung gehen und folglich besser aufgereinigt werden. (J.-B. Li, 2017) Fluorierte Alkohole, wie TFE, kommen hierfür gerne zum Einsatz (A. Berkessel, 2006), (N. H. Andersen, 1999), so auch bei der NCL während der Synthese des Influenza B M2 Protonenkanals {BM2 (1-51)}. (A. A. Tietze, 2018) Die Analyse der NCLs (Abschnitt 7.5.1) war ohne Befund. Zusammenfassend ist über die NCL der **Seq. 1** mit **Seq. 2**, sowie über die NCL von **Seq. 2** mit **Seq. 3**, zu sagen, dass diese wiederholt werden sollten, vorzugsweise nach dem Einbringen von solubilizing tags, oder unter Rücksichtnahme anderer, in dieser Arbeit diskutierter, Lösungsansätze.

## 9. Literaturverzeichnis

- A. A. Tietze, L. K. S. A. C. B. D. T., 2018. *Chemical synthesis of membrane proteins: a model study on the influenza virus B proton channel*, 9, 2365-2375, Darmstadt: Chem. Sci.
- A. A. Cooper, Y.-J. C. M. A. T. H., 1993. *Protein splicing of the yeast TFP1 intervening protein sequence: a model for self-excision*, Vol. 12, 6, 2575-2583, USA: The EMBO Journal.
- A. Berkessel, J. A. A. D. J. M. N., 2006. *Unveiling the "Booster Effect" of Fluorinated Alcohol Solvents: Aggregation-Induced Conformational Changes and Cooperatively Enhanced H-Bonding*, 128, 26, 8421-8426, Köln: J. Am. Chem. Soc.
- B. Ludolph, H. W., 2003. *The synthesis of acid- and base-labile lipopeptides on solid support*, 9, 3683-3691, Dortmund: Chem.-Eur. J.
- Brückner, 2004. *Reaktionsmechanismen, Organische Reaktionen, Stereochemie, Moderne Synthesemethoden*, ISBN 978-3-662-45684-2. Deutschland: Springer Spektrum.
- C. F. Becker, D. O., 2008. *Chemical synthesis and semisynthesis of membrane proteins*, 4, 733-740, Dortmund: Mol. BioSyst.
- C. F. Becker, S. L. M. B. D. O., 2011. *Total chemical synthesis of an integral membrane enzyme: diacylglycerol kinase from Escherichia coli*, 50, 3988-3992, München: Angew. Chem., Int. Ed.
- C. F. W. Becker, 2001. *Chemische Synthese von Proteinen: Generierung biologischer Aktivität ohne Nutzung des zellulären Syntheseapparats*, Dortmund: s.n.
- C. F. W. Becker, G. G. K. D. C., 2005. *Chemical synthesis approaches to the engineering of ion channels*, 12, 737-741, USA: Protein Pept. Lett.
- C. F. W. Becker, M. O.-M. G. G. K. M. M., 2004. *Chemical synthesis and single channel properties of tetrameric and pentameric TASP (template-assembled synthetic proteins) derived from the transmembrane domain of HIV Virus protein u (Vpu)*, 279, 17483-17489, Kalifornien: J. Biol. Chem.
- C. Hyde, T. J. R. C. S., 1992. *Internal aggregation during solid phase peptide synthesis. Dimethyl sulfoxide as a powerful dissociating solvent*, 21, 1573-1575, s.l.: J. Chem. Soc., Chem. Commun.
- C. Hyde, T. J. R. C. S., 1992. *Internal aggregation during solid phase peptide synthesis. Dimethyl sulfoxide as a powerful dissociating solvent*, 21, 1573-1575, s.l.: J. Chem. Soc., Chem. Commun.
- C. J. Norren, J. W. F. B. P., 2000. *Dissecting the Chemistry of Protein Splicing and Its Applications.*, USA: Angew. Chem. Int. Ed. 39, 450-466.
- C. Zuo, S. T. Y. Y. S. Z. A. W. C. L. T. J. S. Z., 2016. *Efficient synthesis of longer A $\beta$  peptides via removable backbone modification*, 14, 5012-5018, China: Org. Biomol. Chem.
- Catterall, W. A., 2000. *Review: From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels*, USA: Neuron.
- Chen, L. Q. e. a., 2010. *Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogenes*. *Nature* 468, 527-532, s.l.: Nature.
- Chen, L. Q. e. a., 2012. *Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport*. 335, 207-211., s.l.: Science.

- D. Clayton, G. S. J. A. M. D. A. D. H. A. L. G. G. K., 2004. *Total chemical synthesis and electrophysiological characterization of mechanosensitive channels from Escherichia coli and Mycobacterium tuberculosis*, 101, 4764-4769, USA: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- Daniel C. Yee, M. A. S. A. V. V. S. R. S. A. E. I. S. a. M. H. S. J., 2013. *The transporter–opsin–G protein-coupled receptor (TOG) superfamily 280*, 5780–5800, USA, Canada: FEBS Journal.
- E. Bianchi, R. I. R. J. S. A. P., 1999. *Engineering and chemical synthesis of a transmembrane protein: the HVC protease cofactor protein NS4A*, 121, 7698-7699, USA: J. Am. Chem. Soc.
- E. C. B. Johnson, E. M. Y. S. D. R. W.-J. T. S. B. H. K., 2007. *Modular total chemical synthesis of a human immunodeficiency virus type 1 protease*, 129, 11480-11490, Wisconsin: J. Am. Chem. Soc.
- E. C. B. Johnson, S. B. H. K., 2006. *Studies on the insolubility of a transmembrane peptide from signal peptide peptidase*, 128, 7140-7141, Chicago: J. Am. Soc.
- F. I. Valiyaveetil, M. L. T. W. M. R. M., 2006. *Ion selectivity in a semisynthetic K<sup>+</sup> Channel locked in the conductive conformation*, 314, 1004-1007, USA: Science.
- F. Liu, J. P. M., 2013. *An Fmoc compatible, O to S shift-mediated procedure for the preparation of C-terminal thioester peptides*, 78, 19, 9848-56, USA: J. Org. Chem.
- G. Chen, J. D. W. J. C. B. W. ., Q. W. S. J. D., 2006. *Studies related to the relative thermodynamic stability of C-terminal peptidyl esters of O-hydroxy thiophenol: emergence of a doable strategy for non-cysteine ligation applicable to the chemical synthesis of glycopeptides*, 128, 23, 7460-2, New York: J. Am. Chem. Soc.
- G. Ebert, Y. K., 1983. *Conformational studies of alternating copoly(Leu-Lys) and copoly(Leu-Orn) in alcohol-water solvent mixtures*, 5, 2, 106-110, Marburg/Lahn, Tokyo: Int. J. Biol. Macromol.
- G. G. Kochendoerfer, D. H. J. S. L. M. O.-M. S. J. O. M. M., 2004. *Functional characterization and NMR spectroscopy on full-length Vpu from HIV-1 prepared by total chemical synthesis*, 126, 2439-2446, USA: J. Am. Chem.
- G. G. Kochendoerfer, D. S. J. D. L. R. W.-O. S. B. H. K. W. F. D., 1999. *Total Chemical Synthesis of the Integral Membrane Protein Influenza A Virus M2: Role of Its C-Terminal, Domain in Tetramer Assembly†*, 38, 37, 11905-11913, USA: American Chemical Society.
- H. Hojo, Y. K. Y. K. S. T. I. T. K. H. S. A., 1993. *Development of a Linker with an enhanced Stability for the Preparation of Peptide Thioesters and its Application to the Synthesis of a Stable-Isotope-Labeled HU-Type DNA-Binding Protein*, Japan: Bull. Chem. Soc. Jpn., 66, 2700-2706.
- J. D. Warren, J. S. M. S. J. K. S. J. D., 2004. *Toward fully synthetic glycoproteins by ultimately convergent routes: a solution to a long-standing problem*, 126, 21, 6576-8, New York: J. Am. Chem. Soc.
- J. P. Overington, B. A.-L. A. L. H., 2006. *How many drug targets are there? Vol. 5*, 993–996, s.l.: Nat. Rev. Drug Discov.
- J.-B. Li, S. T. J.-S. Z. C.-L. T. L. L., 2017. *Removable Backbone Modification Method for the Chemical Synthesis of Membrane Proteins*, 50, 1143-1153, China: Acc. Chem. Res.
- J.-S. Zheng, W.-X. X. F.-L. W. J. L. Q.-X. G., 2011. *Fmoc-SPPS chemistry compatible approach for the generation of (glyco)peptide aryl thioesters*, 52, 21, 2655-2660, China: Tetrahedron Lett.

- K. C. Pugh, E. J. Y. J. M. S., 1992. *Effects of resin swelling and substitution on solid phase synthesis*, 40, 3-4, 208-2013, USA: Int. J. Pept. Protein Res.
- K. P. Fears, S. P. J. L. K. T. D. C., 2014. *Synthesis and characterization of cyclic peptides that are  $\beta$ -helical in trifluoroethanol*, 20, 366-374, USA: J. Pept. Sci.
- Kaplan, R., Feb 2001. *Structure and Function of Mitochondrial Anion Transport Proteins*, N. Y. City, USA: J. of Membrane Biol., Volume 179, Issue 3, pp 165–183.
- L. Brunsveld, A. W. T. D. K. A. R. S. G. H. W., 2005. *Synthesis of Functionalized Rab GTPases by a Combination of Solution- or Solid-Phase Lipopeptide Synthesis with Expressed Protein Ligation*, 11, 2756-2772, Dortmund: Chem.-Eur. J.
- L. E. Canne, S. W. S. B. H. K., 1995. *A General Method For The Synthesis Of Thioester Resin Linkers For Use In The Solid Phase Synthesis Of Peptide-Alpha-Thioacids*, s.l.: Tetrahedron Lett. 36, 1217-1220.
- L. M. Veenhoff, E. H. M. L. H. B. P., 1st May 2002. *Quaternary structure and function of transport proteins*, University of Groningen, The Netherlands: Trends in Biochemical Sciences, Volume 27, Issue 5, Pages 242-249.
- Liang Feng, W. B. F., 2015. *Structure and function of SemiSWEET and SWEET sugar transporters*, Stanford, USA: Elsevier Ltd.
- Lin, I. W. e. a., 2014. *Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9*, 508, 546–549., s.l.: Nature.
- Li-Qing Chen, L. S. C. L. F. W. T. a. W. B. F., 2015. *Transport of Sugars*, 84:15.1–15.30, Stanford, California: Annu. Rev. Biochem.
- M. Beyermann, M. B., 1992. *Synthesis of difficult peptide sequences: a comparison of Fmoc- and Boc-technique*, 33, 3745–3748, USA: Tetrahedron Lett.
- M. H. Saier, J., 2003. *Tracing pathways of transport protein evolution*, University of California at San Diego, La Jolla, CA 92093-0116, USA: Molecular Microbiology 48(5), 1145–1156.
- M. Mutter, K. H. A. D. B. A. F. J. H. M. H. B. K. L. S. T. V. H. U. G., 1985. *Proceedings of the 9th American Peptide Symposium*, 397-405, s.l.: s.n.
- M. Paradís-Bas, J. T.-P. F. A., 2015. *Semipermanent C-terminal carboxylic acid protecting group: application to solubilizing peptides and fragment condensation*, 17, 294-297, Barcelona: Org. Lett.
- M. T. Jacobsen, M. E. P. X. Y. M. G. G. H. L. V. A. M. S. K., 2016. *A helping hand to overcome solubility challenges in chemical protein synthesis*, 138, 11775-11782, USA: J. Am. Chem. Soc.
- N. Eijkelkamp, J. E. L. M. D. B. M. S. M. R. C. R. W. F. R. J. N. W., 2012. *Review: Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels*, Vol. 135, 2585–2612., s.l.: Brain.
- N. H. Andersen, R. B. D. R. M. F. F. G. Z. L. J. W. N. H., 1999. *Effect of Hexafluoroisopropanol on the Thermodynamics of Peptide Secondary Structure Formation*, 121, 42, 9879-9880, New Mexico: J. Am. Chem. Soc.
- P. E. Dawson, T. M. I. C.-L. S. B. H. K., 1994. *Synthesis of proteins by native chemical ligation*, s.l.: Science, 266, 776-779.

- P. W. Harris, M. A. B., 2010. *Toward the total chemical synthesis of the cancer protein NY-ESO-1*, 94, 542-50, Neuseeland: Biopolymers.
- R. C. de L. Milton, S. C. F. M. P. A. A., 1990. *Prediction of difficult sequences in solid-phase peptide synthesis*, 112, 16, 6039-6046, Süd Afrika: J. Am. Chem. Soc.
- S. Chemuru, R. K. R. W., 2014. *Improved chemical synthesis of hydrophobic A $\beta$  peptides using addition of C-terminal lysines later removed by carboxypeptidase B*, 102, 206-221, Pittsburgh: Biopolymers.
- S. K. Maity, G. M. M. J. S. L. G. K. A. B., 2016. *Palladium-assisted removal of asolubilizing tag from a Cys side chain to facilitate peptide and protein synthesis*, 18, 3026-3029, Israel: Org. Lett.
- Sato, T., 2015. *Review, Chemical Synthesis of Transmembrane Peptide and Its Application for Research on the Transmembrane–Juxtamembrane Region of Membrane Protein*, Vol 106, Japan: Peptide Science.
- Sato, T., 2016. *Chemical synthesis of transmembrane peptide and its application for research on the transmembrane-juxtamembrane region of membrane protein*, 106, 4, 613-621, Japan: Biopolymers.
- Sosso, D. C. L. Q. & F. W. B., 2013. in *Encyclopedia of Biophysics Vol. 5 (ed. Roberts, G.)* 2556–2558, s.l.: Springer.
- Sun, M. X. H. X. Y. Y. J. G. Y. F. & Y. Z. N., 2013. *Arabidopsis RPG1 is important for primexine deposition and functions redundantly with RPG2 for plant fertility at the late reproductive stage*, 26, 83–91., s.l.: Plant Reprod.
- T. Sato, Y. S. S. A., 2005. *Synthesis of the C-terminal region of opioid receptor like 1 in a SDS micelle by the native chemical ligation: effect of thiol additive and SDS concentration on ligation efficiency*, 11, 410-416, Japan: J. Pept. Sci.
- V. V. Yim, I. K. A. J. C. P. W. R. H. M. A. B., 2020. *Direct synthesis of cyclic lipopeptides using intramolecular native chemical ligation and thiol–ene CLipPA chemistry*, *Org. Biomol. Chem.*, s.l.: The Royal Society of Chemistry.
- William H. Elliott, D. C. E. T. E., 1997, 2001 and 2005. *Biochemistry and Molecular Biology*, USA: Oxford University Press.
- X. Hou, L. J., 2009. *Learning from Nature: Building Bio-Inspired Smart Nanochannels*, China: acsnano, Vol. 3, Nr. 11.
- X. Hou, L. J., 2009. *Learning from nature: building bio-inspired smart nanochannels*, 3, 11, 3339-3342, China: ACS Nano.
- Xuan, Y. H. e. a., 2013. *Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. 110*, E3685–E3694., USA: Proc.Natl Acad. Sci.
- Y. Arinaminpathy, E. K. D. M. E. M. B. G., 2009. *Review: Computational analysis of membrane proteins: the largest class of drug targets*, USA: Elsevier.
- Y. Ashina, S. K. T. T. N. N. H. H., 2013. *Chemoenzymatic synthesis of the immunoglobulin domain of Tim-3 carrying a complex-type N-glycan by using a one-pot ligation*, 52, 9733-9737, Japan: Angew. Chem., Int. Ed.
- Y. C. Huang, Y. M. L. Y. C. M. P. Y. T. L. L. Y. Q. X. G. L. L., 2013. *Synthesis of autophagosomal marker protein LC3-II under detergent-free conditions*, 52, 4858-4862, China: Angew. Chem., Int. Ed.

Y. J. Chung, M. H. S. J., Mar 2001. *SMR-type multidrug resistance pumps*, Department of Biology, University of California at San Diego, La Jolla, CA 92093, USA.: *Curr Opin Drug Discov Devel.* 4(2):237-45.

Y. Sohma, M. S. Y. H. T. K. Y. K., 2004. *Novel and efficient synthesis of difficult sequence-containing peptides through O-N intramolecular acyl migration reaction of O-acyl isopeptides*, 124-125, Japan: *Chem. Commun.*

Yan Xu, Y. T. L. S. C., Nov 2014. *Structures of bacterial homologues of SWEET transporters in two distinct conformations*, USA: Vol 515 *Nature*.

Z. Tan, S. S. S. J. D., 2011. *Rational development of a strategy for modifying the aggregability of proteins*, 108, 4297-4302, New York: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

## 10. Danksagung

Gleich zu Beginn ein großes Dankeschön an Alle jene die an mich geglaubt haben, dass ich diese Masterarbeit erfolgreich abschließen werde und mir in meiner schweren Zeit beigestanden sind!

Danke, Univ.-Prof. Dr. Christian Friedrich Wilhelm Becker, für die Möglichkeit, trotz anfänglicher Schwierigkeiten, meinen Master bei dir machen zu können, sowie deiner grenzenlosen Geduld. Danke Christian, dass du mich nicht aufgegeben hast.

Ich möchte auch all meinen Kollegen Dank sagen, welche mich in dieser Zeit geschult haben, sei es auf Zuweisung von Univ. Prof. Dr. Becker aber auch jenen welche sich ohne Zuteilung meiner angenommen haben. Danke auch für die lustigen Kaffeepausen. Großer Dank an Manuel Felkl, danke Lukas Kerul, danke Friedrich Bialas, danke Patrick, Giliana & Maggy und großes Dankeschön an Manuel Hafner.

Herzlichster Dank gilt meiner Familie für den Beistand, den Zusammenhalt, die Unterstützung und den unerschütterlichen Glauben an mich. Zu meiner Familie zähle ich nicht nur meine Geschwister und meine Mutter, sondern auch meine angeheiratete Familie, und ganz besonders meinen Ehemann, Christopher Abler und meinen besten Freund, Erwin Schaier. Danke, Christopher und Erwin, dass ihr immer für mich da seid! Danke dass ihr diesen Weg gemeinsam mit mir gemeistert habt!