

# Rekonstitution des katalytischen $(\alpha\beta)_3\gamma$ -Kernkomplexes der F-ATPase aus *Escherichia coli* mithilfe der chemisch synthetisierten Untereinheit $\gamma^{**}$

Frank Wintermann\* und Siegfried Engelbrecht\*

Der größte Teil an ATP, das von höheren Organismen verbraucht wird, entsteht direkt aus ADP und  $P_i$ . Diese endergone Reaktion erfordert beides, Katalyse und die Zufuhr freier Energie. Letztere wird durch die Ionen-motorische Kraft über die die ATP-Synthase ( $F_0F_1$ ) enthaltende Kopplungsmembran bereit gestellt. Ein Ionenfluss durch den in die Membran eingebetteten  $F_0$ -Teil resultiert in der gerichteten mechanischen Rotation des Rotorteils des Enzyms, die durch elastische Kopplung spontan gebildetes, aber fest gebundenes ATP aus den reaktiven Zentren freisetzt. Das elektrochemische Potential des „Kopplungsions“ wird also mechanisch an die chemische Reaktion angekoppelt. Neuere Übersichten dazu finden sich in Lit. [1–4]. Die ATP-Synthase arbeitet vollständig reversibel: Sie nutzt die Ionen-motorische Kraft für die ATP-Synthese, und erzeugt durch die ATP-Hydrolyse eine Ionen-motorische Kraft. Diese beiden Betriebszustände sind strikt an eine Rotation im oder gegen den Uhrzeigersinn gekoppelt. Es steht zu vermuten, dass die jeweilige Rotationsrichtung durch die stereochemische Konfiguration des Enzyms vorgegeben ist.

Eine Kopplung der Konfiguration mit der Funktion wurde bereits für die HIV-Protease gezeigt.<sup>[5]</sup> Dagegen war eine rein physikochemische Wechselwirkung, beispielsweise zwischen

einem Frostschutzprotein und Wasser, von der Konfiguration unabhängig.<sup>[6]</sup> Wegen der mechanischen Zwischenstufe bei der Katalyse stellt die ATP-Synthase einen interessanten Sonderfall dar. Bei einem  $F_0F_1$  ausschließlich aus D-Aminosäuren sollte auch die Struktur-Funktions-Beziehung gespiegelt sein. Da der zentrale Rotorteil des Enzyms, die Untereinheit  $\gamma$ , prinzipiell in beide Richtungen rotieren kann, wäre unter Umständen sogar zu erwarten, dass das Spiegelbild von  $\gamma$  weiterhin mit der Enzymfunktion kompatibel ist, da sich die molekularen Oberflächen von L- und D- $\gamma$  sehr ähneln. Ob ein F-ATPase-Kernkomplex aus den L-Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  und synthetischem D- $\gamma$  tatsächlich seine katalytische Aktivität behält und, falls ja, auch die Beziehung zwischen Rotationsrichtung und Funktion, kann nur experimentell entschieden werden.

Ein solches Unterfangen würde die chemische Totalsynthese des 286 Reste umfassenden D-Enantiomers von  $\gamma$  und die anschließende Rekonstitution des katalytisch aktiven Enzym-Kernkomplexes erfordern. Die Synthesewerkzeuge für dieses Ziel wurden in den letzten Jahrzehnten entwickelt und verfeinert.<sup>[7,8]</sup> Als ersten Schritt in diese Richtung haben wir die F-ATPase-Untereinheit L- $\gamma$  von *Escherichia coli* (hier als „ $\gamma_{\text{synth}}$ “ bezeichnet) synthetisiert und erfolgreich mit den nativen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  zum katalytischen Kernkomplex der F-ATPase,  $(\alpha\beta)_3\gamma_{\text{synth}}$ , rekonstituiert. Abweichungen in der Sequenz von  $\gamma_{\text{synth}}$  von der nativen Sequenz werden weiter unten beschrieben.

Wegen seiner Länge haben wir  $\gamma$  in sechs Peptide mit 38 bis 58 Resten aufgeteilt, in der Hoffnung auf eine problemlose Peptidsynthese und auf Kompatibilität mit den Erfordernissen der nativen chemischen Ligation<sup>[7]</sup> bei zugleich größtmöglicher Isosterie (Schema 1).

Kosten-, Ausbeute- und Reinheitserwägungen sprachen für die Boc- anstelle der Fmoc-Chemie für die Festphasensynthese. Angesichts der dokumentierten Beispiele zogen wir die konsekutive chemische Ligation<sup>[7]</sup> der konvergenten Vorgehensweise<sup>[10–12]</sup> zur Synthese des Volllängenproteins vor (Schema 2). Der Eintopfansatz<sup>[9]</sup> wurde bei den ersten drei Ligationen zwar probiert, ergab jedoch nur unbefriedigende Ergebnisse.

Bei der nativen chemischen Ligation (NCL) werden natürliche Peptidbindungen gebildet, doch dazu ist ein Thioester am C-Terminus von Peptid  $i$  und ein Cysteinrest am N-Terminus von Peptid  $i+1$  notwendig.<sup>[7]</sup> Der Rest mit der Thioestereinheit anstelle der üblichen Carboxygruppe darf weder an C $\beta$  verzweigt noch ein Aspartat- oder Glutamatrest sein.<sup>[13]</sup> Daher waren fünf Sequenzänderungen unvermeidlich (N59C, K108C, S146C, S193C und S237C). Der Ersatz von

[\*] F. Wintermann, S. Engelbrecht  
Universität Osnabrück, Fachbereich Biologie/Chemie  
Abt. Biochemie  
Barbarastraße 13, 49076 Osnabrück (Deutschland)  
E-Mail: frank.wintermann@biologie.uni-osnabrueck.de  
engel@uos.de

[\*\*] Unser Dank gilt Martin Engelhard und Marc Dittmann (beide MPI Dortmund) für Diskussionen und Unterstützung, insbesondere die Erlaubnis, ihre HF-Apparatur und andere Laborausstattungen zu nutzen. Des Weiteren danken wir Stephen Kent und Kalyaneswar Mandel (beide University of Chicago) für ihre Unterstützung und ein großzügiges Geschenk der PAM-Matrix, mehrere Testpeptide und einen überaus erfreulichen Aufenthalt im dortigen Labor (F.W.). Dank geht an Julia Paul für ihre wegbereitenden Experimente zur Präparation der Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  und an André Wächter für eine Probe überexprimierter Untereinheit  $\gamma$  sowie an Oliver Pänke (alle seinerzeit Universität Osnabrück) für Diskussionen. Unser ganz besonderer Dank gilt Stefan Walter für seine Unterstützung bei der Massenspektrometrie sowie Wolfgang Junge und Christian Ungermann für ihre Unterstützung des Projekts an sich (alle Universität Osnabrück). Wir danken für die finanzielle Unterstützung durch den SFB 431 (Deutsche Forschungsgemeinschaft) und das Nanomot-Projekt (Europäische Union). F.W. dankt für ein EMBO-Kurzzeitstipendium (ASTF 225-2009), das ihm einen Aufenthalt bei Stephen Kent ermöglicht hat.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201206744> zu finden.

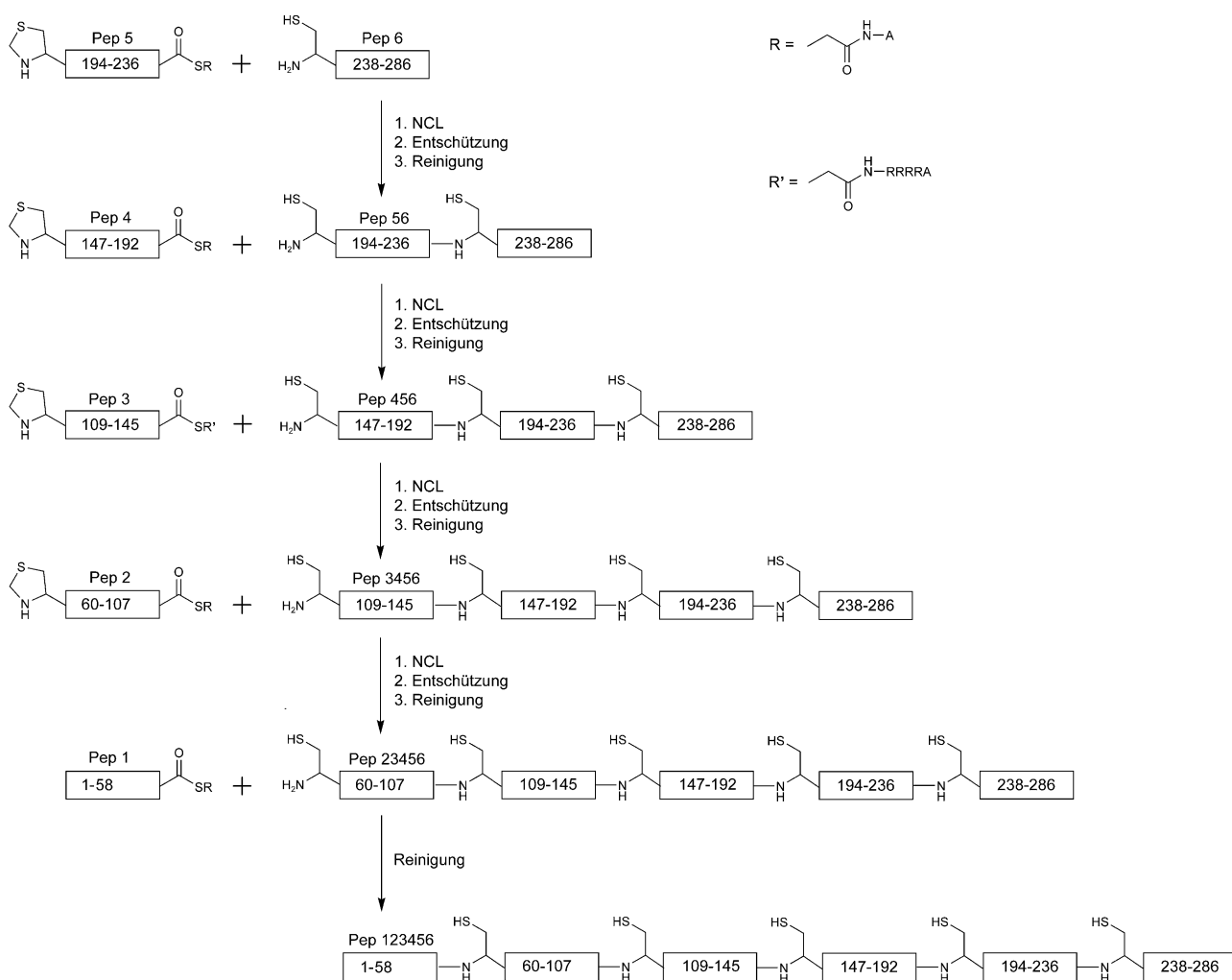
Peptid	Zahl der Reste	Sequenz	Masse [Da]
1 (1-58)	58	AGAKDIRSKIASVQNTQKITKAMEMVAASKMRKSQDRMAASRPYAETMRKVIGHLAHGXA	6516.6
2 (59-107)	49	ZLEYKHPYLEDRDVKRVGYLVVSTDRGLAGGLNINLFKLLAEMKTWTAXA	5825.8
3 (108-145)	38	ZGVQADLAMIGSKGVFFNSVGGNVVAQVTGMGDNPSLXRRRRA	4524.2
4 (146-192)	47	ZELIGPVKVMQLQAYDEGRDLKLYIVSNKFINTMSQVPTISQLPLPAXA	5419.5
5 (193-236)	44	ZDDDDLKHKSWDLYEPDPKALLDTLLRRYVESQVYQGVVENLAXA	5386.0
6 (237-286)	50	CEQAARMVAMKAATDNGGSLIKELQLVYNKARQASITQELTEIVSGAAAA	5222.9

**Schema 1.** Sequenzen der synthetischen Peptide der F-ATPase-Untereinheit  $\gamma$  aus *E. coli*. Der N-terminale Methioninrest, der in UniProt (<http://www.uniprot.org>, Datenbankeintrag P0ABA6) angegeben wird, ist in der reifen Kette nicht vorhanden und daher hier nicht berücksichtigt. Die  $\gamma$ -Sequenz wurde entsprechend umnummeriert. Änderungen im Vergleich zur nativen Sequenz von  $\gamma$  sind fettgedruckt. Nach dem Abspalten von der Matrix ergibt bei Peptid 1–5 der Rest X das Thioesterderivat (S-Trityl- $\beta$ -mercaptopropionsäure) des vorangehenden Rests. Z in Peptid 2–5 steht für geschütztes Cystein, das über Thz<sup>[9]</sup> eingeführt wurde und nach der Ligation zweier Peptide und dem Entschützen in Cystein umgewandelt wird. Peptid 6 enthält daher von Anfang an einen N-terminalen ungeschützten Cysteinrest. Die C-terminalen Alaninreste in den Peptiden 1, 2, 4 und 5 und die für die Peptidreinigung erforderliche RRRRA-Sequenz am C-Terminus von Peptid 3 werden durch die native chemische Ligation entfernt.

Da C108 weiterhin für die Mikrovideographie benötigt wurde und angesichts der denkbaren Nebenreaktionen bei einer weiteren chemischen Modifikation, wurde die Entschwefelung der eingeführten Cysteinreste nicht erwogen. Stattdessen wurde  $\gamma$  mit diesen sieben Punktmutationen mittels PCR erzeugt und in einem Kontrollexperiment geprüft. Es verhielt sich bezüglich Biosynthese, Zellwachstum, Reinigung, ATPase-Aktivität und Rotation innerhalb des immobilisierten F-ATPase-Kernkomplexes genauso wie die Wildtyp-Untereinheit (Daten nicht gezeigt).<sup>[14,15]</sup>

Cysteinresten in der nativen Sequenz durch Alaninreste (C87A und C112A) und die Einführung eines neuen Cysteinrests anstelle von Lysin 108 (K108C) waren bereits zuvor durchgeführt worden, um EF<sub>1</sub> auf die mikrovideographischen Erfordernisse von Rotationsexperimenten vorzubereiten.<sup>[14]</sup>

Abgesehen von den oben genannten Sequenzänderungen ergaben sich vier weitere im Verlauf der Synthese, die so nicht vorhersehbar waren, und zwar folgende: 1) E5D in Peptid 1,



**Schema 2.** Synthesepan zur chemischen Totalsynthese der Untereinheit  $\gamma$  der F-ATPase aus *E. coli*.

bedingt durch einen Fehler in unserer Datenbank, den wir erst kurz vor dem Abschluss der Ligationen bemerkten. Angesichts der außerordentlich aufwendigen Korrektur, die der Fehler zu diesem Zeitpunkt erfordert hätte, entschieden wir uns, ihn hinzunehmen. 2) W203 in Peptid 5 ist auf eine anders geschützte Aminosäure als für W105 in Peptid 2 zurückzuführen (*tert*-Butyloxycarbonyltryptophan, Boc-Trp-CHO, statt Boc-Trp-OH). Erstere Gruppe ließ sich durch das Standardverfahren nicht entschützen, sondern behielt die Formaldehydeinheit (siehe die Hintergrundinformationen) und repräsentiert damit die deutlichste Abweichung vom ribosomal synthetisierten Protein. Glücklicherweise liegt W203 am äußersten Rand der Untereinheit  $\gamma$ , außerhalb der Oberflächen, über die der Kontakt mit dem  $(\alpha\beta)_3$ -Hexagon hergestellt wird (pdb: 3oaa),<sup>[16]</sup> sodass es mit der Rotation und daher auch mit der ATPase-Aktivität nicht interferiert. 3) Des Weiteren zeigte sich, dass D107 durch einen Alaninrest ersetzt werden musste. Die geladene Seitenkette des Aspartatrests führte bei der chemischen Ligation zu einem Nebenprodukt, was die Gesamtausbeute signifikant verschlechterte.<sup>[13]</sup> 4) Die Substitution V286A war notwendig, da der Valin-PAM-Linker nicht quantitativ mit der Synthesematrix reagierte, sodass Teile der wachsenden Kette direkt und irreversibel an die Matrix gebunden wurden. Da bis zu zwölf C-terminale Reste von der *E. coli*-F<sub>1</sub>- $\gamma$ -Untereinheit entfernt werden können, ohne dass dies die Aktivität restlos aufheben würde,<sup>[17]</sup> wurde diese letzte Änderung als vergleichsweise unerheblich angesehen.

Die Untereinheit  $\gamma$  ist relativ unempfindlich gegen Sequenzänderungen,<sup>[2]</sup> was schon der geringe Sequenzerhalt in unterschiedlichen Spezies zeigt und angesichts der vorwiegend mechanischen Rolle von  $\gamma$  wenig überrascht. Im vorliegenden Kontext mit insgesamt elf Sequenzänderungen erwies sich diese Eigenschaft von  $\gamma$  allerdings als recht günstig.

Nach dem Abspalten von der Synthesematrix und dem Entschützen mit Flusssäure wurden die Rohpeptide hochdruckflüssigkeitschromatographisch mit einem Trifluoressigsäure/Acetonitril/Wasser-Puffersystem an C<sub>4</sub>-Umkehrphasen-Matrizes gereinigt. Die Eluierung wurde für jedes Peptid in analytischen Chromatographieläufen mit 1-mg-Proben optimiert; daran schlossen sich die präparativen Trennungen an.<sup>[18]</sup> Die Identität der eluierten Peptide wurde durch Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie bestätigt (siehe die Hintergrundinformationen).

Die fünf zum Aufbau des vollständigen Proteins erforderlichen Ligationen wurden gemäß Standardprotokoll durchgeführt, mit eingeschobenen massenspektrometrischen Analysen der Ligationsprodukte und Kontrollen der zeitlichen Ligrationsverläufe sowie flüssigkeitschromatographischen Reinigungen der Ligationsprodukte. Die Produkte der beiden ersten Ligationen (Peptide 5 + 6  $\Rightarrow$  Peptid 56 und Peptide 4 + 56  $\Rightarrow$  Peptid 456) wurden nach 23 h Reaktionszeit direkt im Ligrationsansatz entschützt. Bei den folgenden drei Ligationen wurde der Ligrationsansatz zuerst chromatographisch gereinigt und danach mit Methoxyaminhydrochlorid (MAH) zum Entschützen versetzt, ohne das MAH anschließend zu entfernen. Andernfalls gingen die Peptide 3 und 3456 bei der Chromatographie

verloren. Diese Vorgehensweise war jedoch nicht auf die letzte Ligation anwendbar (Peptide 1 + 23456), da Peptid 1 unerwarteterweise quantitativ mit MAH reagierte (Signal bei  $m/z$  [(erwartete Peptidmasse) + 29] Da, Daten nicht gezeigt) und danach nicht mehr ligierte. Daher musste in diesem Fall der gesamte Ligrationsansatz rechromatographiert werden, was leider in weiteren Verlusten an Ligrationsprodukt resultierte.

Diese Nebenreaktion muss mit dem Thioester erfolgt sein; sie wurde vermutlich durch die Sequenz von Peptid 1 hervorgerufen (...AHGXA, vgl. Schema 1). Dies würde die allgemeine Verwendbarkeit der 1,3-Thiazolidin(Thz)-Schutzgruppe insbesondere bei Eintopf-Ligationen<sup>[9]</sup> einschränken und alternative Vorgehensweisen erfordern. Künftige Syntheseansätze sollten daher diese beiden unerwünschten Nebeneffekte berücksichtigen: den Verlust entschützter Peptidreste bei der Chromatographie und die MAH-Nebenreaktion.

In Tabelle 1 sind die Ausbeuten und in Abbildung 1 die Chromatographien mit den gereinigten Ligrationsprodukten zusammengefasst. Für die Rekonstitution wurden die Un-

**Tabelle 1:** Ausbeuten der Peptidligationen. Die Gesamtsynthese wurde mit 115 mg Peptid 6 und 142 mg Peptid 5 begonnen.

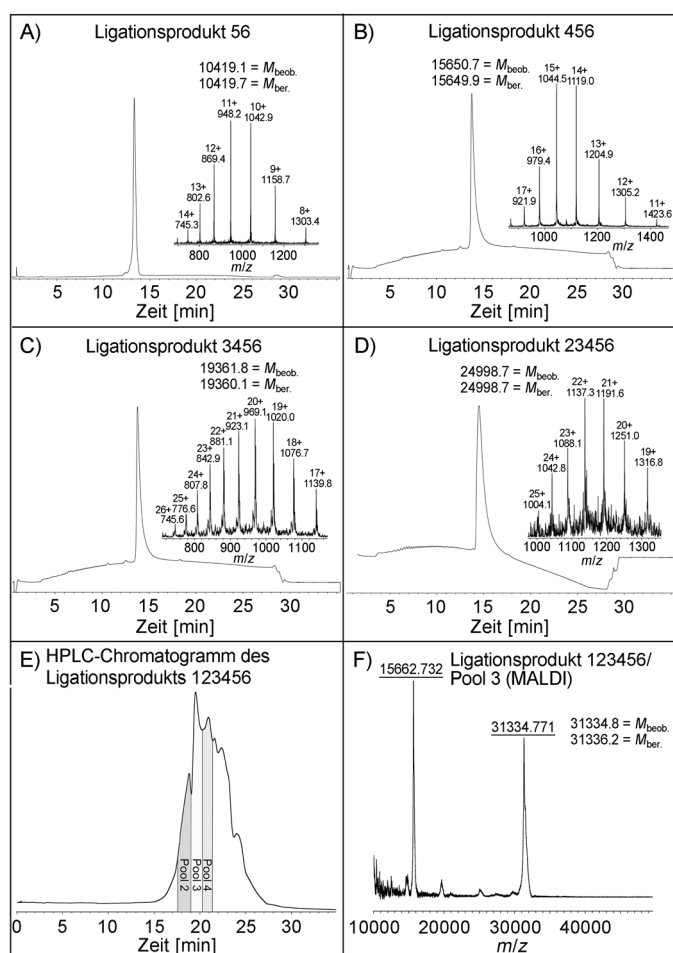
Eduktpeptid	Eduktpeptid	Ligationsprodukt	Ausbeute mg   %
6	5	56	69   30
56	4	456	24.3   23.5
456	3	3456	2.6   8.5
3456	2	23456	0.33   10
23456	1	$\gamma_{\text{synth}}$	0.03   8

tereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  in Gegenwart von ATP gemischt, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach gelfiltriert.<sup>[19]</sup> Der Peak, der das vollständige Enzym enthielt, war von denen der Untereinheiten klar zu unterscheiden. Das Material wurde mittels Ni-NTA-Chromatographie weiter konzentriert und durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und mit einem ATPase-Test geprüft. Abbildung 2 zeigt die Chromatographien für  $(\alpha\beta)_3\gamma$ -Komplexe, die mit dem ribosomal oder dem chemisch synthetisierten  $\gamma$  rekonstituiert wurden.

Die ATPase-Aktivitäten der verschiedenen rekonstituierten Enzym-Kernkomplexe sind in Tabelle 2 zusammengefasst ( $\gamma_{\text{synth}}$  stammt dabei aus Pool 3 der Chromatographie des letzten Ligrationsprodukts (vgl. Abbildung 1 E); die Pools 2 und 4 eluierten in dieser Chromatographie vor bzw. nach Pool 3 und ergaben in der Rekonstitution kein aktives

**Tabelle 2:** ATPase-Aktivitäten von EF<sub>1</sub> (frisch aus einem EDTA-Extrakt gereinigt) und rekonstituiertem, gereinigtem EF<sub>1</sub>-Kernkomplex  $(\alpha\beta)_3\gamma$ . Gelistet sind die Mittelwerte der Messungen. Die ATPase-Aktivität ist als hydrolytisch erzeugte Menge an Phosphat in  $\mu\text{Mol pro min und mg Enzym}$  angegeben.

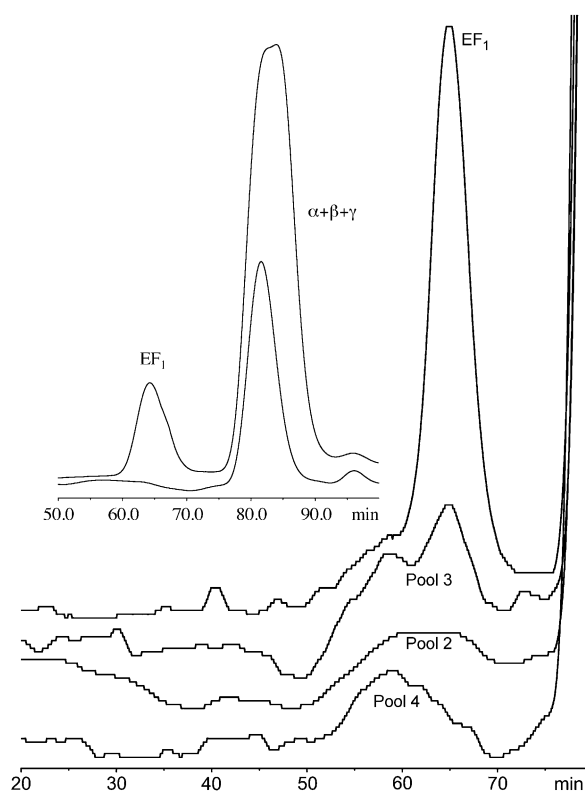
Probe	ATPase-Aktivität (Zahl der Messungen)
EF <sub>1</sub>	100 $\pm$ 10 ( $n=8$ )
$(\alpha\beta)_3\gamma_{\text{nativ}}$	98 $\pm$ 6 ( $n=3$ )
$(\alpha\beta)_3\gamma_{\text{synth}}$	98 $\pm$ 6 ( $n=3$ )



**Abbildung 1.** Chromatographieläufe und Massenspektrogramme der Ligationsprodukte. Anders als bei allen anderen Chromatographien wurde beim Ligationsprodukt 123456 ein linearer Gradient von 30–70% Puffer B während 80 min bei 40°C eingesetzt. Puffer A: 0.1% TFA in 10% Acetonitril/H<sub>2</sub>O; Puffer B: 0.08% TFA in 100% Acetonitril (Teilbild E). Das Peptid „123456“ (Pool 3 =  $\gamma_{\text{synth}}$ ) ging in der LC-ESI-Massenspektrometrie verloren und wurde daher mittels MALDI-Massenspektrometrie analysiert (Teilbild F).

Enzym); sie sind im Rahmen der Messgenauigkeit ununterscheidbar. Weitere Details der Rekonstitutionen und zusätzliche Daten zur Ausbeute an rekonstituiertem Enzym finden sich in den Hintergrundinformationen. Die Reinheit der isolierten Untereinheiten und der (rekonstituierten) Enzym-(Kern)komplexe wurde in SDS-Elektrophoresen bestätigt (Abbildung 3).

Das hier vorgestellte biologisch aktive Protein mit 286 Resten repräsentiert die derzeit längste nichtredundante totalsynthetische Polypeptidkette. Das Hauptmanko unserer Synthese ist die sehr geringe Ausbeute. Sie war nicht durch den Mangel an einzelnen Peptiden bedingt, sondern durch die mäßigen Ausbeuten der fünf aufeinanderfolgenden Ligationen, vor allem der drei letzten Ligationen, die die Gesamtausbeute auf nur 0.005% drückten. Vor-Ort-Gründe veranlassten uns, auf diese geringen Ligationsausbeuten lediglich durch Erhöhung der Eduktmengen zu reagieren. Anders als bei der kürzlich publizierten Totalsynthese von Tetraubiquitin<sup>[20]</sup> könnte in unserem Fall der Abfall der Ligationsausbeuten auf eine Abhängigkeit von der Peptidlänge und

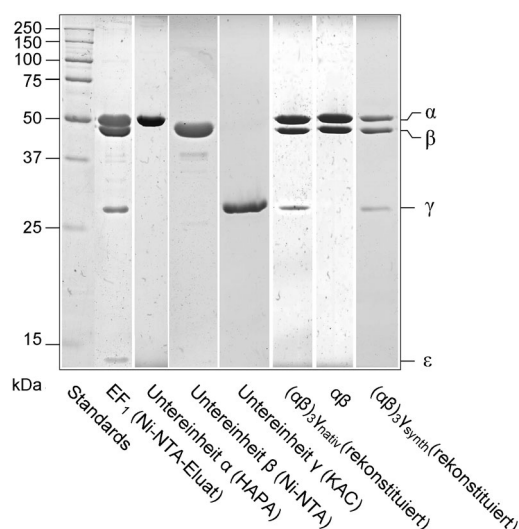


**Abbildung 2.** Gelfiltration des rekonstituierten Kernkomplexes der ATPase ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> $\gamma$ . UV-Spuren (280 nm) präparativer Läufe mit kleinen Probenmengen. GE Superdex 200, 16×600 mm, 0.5 mL min<sup>-1</sup>. Hauptbild, obere Spur: Rekonstitution mit der biosynthetischen Untereinheit  $\gamma_{\text{nativ}}$ ; folgende drei Spuren: Rekonstitutionen mit chemisch synthetisiertem  $\gamma_{\text{synth}}$  aus den in Abbildung 1 E als Pool 4, 3 bzw. 2 bezeichneten Fraktionen der Chromatographie des finalen Ligationsprodukts. Der mit „EF<sub>1</sub>“ bezeichnete Peak enthielt etwa 6  $\mu$ g Protein aus einer Rekonstitution mit je 90  $\mu$ g der Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  und 20  $\mu$ g  $\gamma_{\text{nativ}}$  der Peak aus Pool 3 enthielt etwa 1.5  $\mu$ g Protein aus  $\alpha + \beta + \gamma_{\text{synth}} = 23 + 23 + 5 \mu$ g. Einschub: Gelfiltrationsläufe mit rekonstituiertem Kernkomplex der F-ATPase mit und ohne die Untereinheit  $\gamma_{\text{nativ}}$ . Der hier als „EF<sub>1</sub>“ bezeichnete Peak enthielt 68  $\mu$ g Protein (Rekonstitution von je 1 mg der Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  und 222  $\mu$ g  $\gamma$ ).

möglicherweise der Zahl der enthaltenen Cysteinreste hindeuten. Eine Optimierung des Verhältnisses „Zahl der Ligationen“ zu „Peptidlänge“ wäre einen Versuch wert, denn weniger Ligationen könnten die Ausbeuteverluste bei längeren Peptiden wettmachen. Daneben sind kinetisch kontrollierte Ligationen eine mögliche experimentelle Alternative. Ungeachtet der genannten Probleme und der extrem geringen Gesamtausbeute haben sich die enormen präparativen und analytischen Anstrengungen, die zur Erlangung der vorgelegten Ergebnisse erforderlich waren, insofern gelohnt, als letztlich ein biologisch aktives Protein synthetisiert wurde. Wir betrachten dies als Ermutigung für künftige Ansätze zur Proteinsynthese.

### Experimentelles

EF<sub>1</sub> wurde mit EDTA aus Membranen extrahiert und mittels Anionenaustausch-Chromatographie und Ni-NTA-Chromatographie weiter gereinigt. Die Untereinheit  $\alpha$  wurde aus dissoziiertem EF<sub>1</sub> durch



**Abbildung 3.** SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (12.5 % Laemmli-Gel) von EF<sub>1</sub>, den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  sowie rekonstituierten Enzym-Kernkomplexen mit biosynthetisch  $((\alpha\beta)_3\gamma_{\text{nativ}})$  oder chemisch hergestellter Untereinheit  $\gamma$   $((\alpha\beta)_3\gamma_{\text{synth}}$  mit  $\gamma$  aus Pool 3). Die Probe „ $\alpha\beta$ “ entstammte einem Rekonstitutionsansatz ohne  $\gamma$ . Die Spuren wurden mit je 10  $\mu\text{g}$  Protein beladen, außer bei  $(\alpha\beta)_3\gamma_{\text{synth}}$  (rekonstituiert), von dem nur 3  $\mu\text{g}$  aufgegeben wurden. Für Details siehe *Experimentelles*.

Ni-NTA- und anschließende Hydroxylapatit-Chromatographie erhalten, die Untereinheit  $\beta$  aus dissoziiertem EF<sub>1</sub> durch Ni-NTA-Chromatographie. Die Untereinheit  $\gamma$  wurde in *E. coli* überexprimiert und durch Kationenaustausch-Chromatographie in Gegenwart von 8 M Harnstoff gereinigt. Zur Rekonstitution wurden die Untereinheiten etwa im stöchiometrischen Verhältnis 3:3:1 gemischt und dann weiter prozessiert, wie in den Hintergrundinformationen ausgeführt ist.

Eingegangen am 20. August 2012

Online veröffentlicht am 5. Dezember 2012

**Stichwörter:** ATP-Synthasen · Native chemische Ligation · Proteinsynthesen · Untereinheit  $\gamma$

- [1] A. E. Senior, *Cell* **2007**, 130, 220–221.
- [2] W. Junge, H. Sielaff, S. Engelbrecht, *Nature* **2009**, 459, 364–370.
- [3] C. Von Ballmoos, A. Wiedenmann, P. Dimroth, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, 78, 649–672.
- [4] D. Okuno, R. Iino, H. Noji, *J. Biochem.* **2011**, 149, 655–664.
- [5] R. C. Milton, S. C. Milton, S. B. Kent, *Science* **1992**, 256, 1445–1448.
- [6] B. L. Pentelute, Z. P. Gates, J. L. Dashnau, J. M. Vanderkooi, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9702–9707.
- [7] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, 266, 776–779.
- [8] S. B. H. Kent, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 338.
- [9] D. Bang, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 2588–2592; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2534–2538.
- [10] D. Bang, B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4089–4092; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3985–3988.
- [11] T. Durek, V. Y. Torbeev, S. B. H. Kent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 4846–4851.
- [12] V. Y. Torbeev, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 1697–1700; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1667–1670.
- [13] M. Villain, H. Gaertner, P. Botti, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3267–3272.
- [14] H. Noji, K. Häsler, W. Junge, K. Kinosita, M. Yoshida, S. Engelbrecht, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 260, 597–599.
- [15] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinosita, *Nature* **1997**, 386, 299–302.
- [16] G. Cingolani, T. M. Duncan, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, 18, 701–707.
- [17] M. Müller, O. Pänke, W. Junge, S. Engelbrecht, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 23308–23313.
- [18] Y. Chen, C. T. Mant, R. S. Hodges, *J. Chromatogr. A* **2007**, 1140, 112–120.
- [19] S. D. Dunn, M. Futai, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 113–118.
- [20] K. S. A. Kumar, S. N. Bavikar, L. Spasser, T. Moyal, S. Ohayon, A. Brik, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 6261–6265; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 6137–6141.