

*Design, Synthese und Stabilität von
 β -Faltblatt Modellpeptiden*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Fachbereich Biochemie/ Biotechnologie

von

Sandra Tremmel
geb. am: 29.08.1975 in Mannheim-Neckarau

Gutachter: 1. Prof. Dr. K. Neubert, Institut für Biochemie, Universität Halle
2. Prof. Dr. A. Beck-Sickinger, Institut für Biochemie, Universität Leipzig

verteidigt am: 14.07.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008825

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008825>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	β -Faltblatt Struktur und Design	7
1.2	Die WW-Domäne	11
1.3	Chemische Synthese von Proteinen	14
2	Zielsetzung der Arbeit	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Materialien	19
3.1.1	Chemikalien	19
3.1.2	Aminosäure-Derivate und Synthescharze	20
3.2	Methoden	22
3.2.1	Automatisierte Peptidsynthese	22
3.2.2	Manuelle Peptidsynthese	22
3.2.3	Herstellung von Dcpm-Ala-Ala- β -Naphthylamid	25
3.2.4	Schützen von Aminosäuren	25
3.2.5	Reinigung und Charakterisierung der Peptide	26
3.2.6	CD-Spektroskopie	27
3.2.7	Fluoreszenz-Spektroskopie	28
3.2.8	Temperatursprung-Experimente	29
3.2.9	FT-IR Spektroskopie	30
4	Ergebnisse und Diskussion	32
4.1	Erarbeitung einer effizienten Synthesestrategie zum Aufbau von FBP28 WW-Peptiden mittels Festphasensynthese	32
4.1.1	Erprobung von Standardmethoden und Ursachen für das Scheitern der Synthesen	32

4.1.2	Verhinderung von Aspartimidbildung	35
4.1.3	Reversible Modifizierung des Peptidrückgrates	36
4.2	Untersuchung der β -Faltblatt-stabilisierenden Synergien von Aminosäure-Seitenketten und des Beitrags von Glutamin-Seitenketten	44
4.2.1	Design der FBP28 WW-Varianten	44
4.2.2	Untersuchung des Einflusses der Mutationen auf die thermodynamische Stabilität von FBP28 WW	46
4.2.3	Untersuchung der Bedeutung spezifischer Wechselwirkungen für die Stabilität von FBP28 WW	54
4.2.4	Design und Stabilität kleiner Glutamin-enthaltender β -Haarnadel-Modelle	58
4.2.5	Einfluß der Mutationen auf die Faltungskinetik der FBP28 WW-Domäne	62
4.3	Bedeutung der aromatischen Aminosäuren	66
4.3.1	Untersuchung der stabilisierenden Wechselwirkung konservierter aromatischer Aminosäuren auf Einzelatom-Ebene	67
4.3.2	Studium des Mikromilieus von Tyrosin-Seitenketten in FBP28 WW .	71
5	Zusammenfassung und Ausblick	79
6	Literaturverzeichnis	81

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
a.u.	willkürliche Einheit (arbitrary units)
ARIA	Ambiguous Restraints in Iterative Assignment
B	1-Methyl-Tryptophan
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bsmoc	1,1-Dioxobenzo[<i>b</i>]thiophen-2-ylmethyloxycarbonyl
Bzl	Benzyl
Cha	Cyclohexylalanin
CD	Circulardichroismus
CYANA	Combined assignment and dynamics algorithm for NMR applications
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
Dcpm	Dicyclopropylmethyl
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
Dnbs	Dinitrobenzylsulfonyl
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9-Fluorenylmethyloxycarbonyloxy)succinimid
FT-IR	Fourier Transformierte Infrarot-(Spektroskopie)
HATU	<i>N</i> -[(Dimethylamino)(1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-1-yl)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium hexafluorophosphat <i>N</i> -Oxid
HBTU	<i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium hexafluorophosphat <i>N</i> -Oxid
Hmb	2-Hydroxy-4-methoxybenzyl
HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/ Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)

Abkürzungen

NMI	1-Methyl-imidazol
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance)
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (Nuclear Overhauser Effect)
NOESY	Spektroskopie mit Kern-Overhauser-Effekt und Austausch (Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy)
p	D-Prolin
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PDB	Proteindatenbank
RP-HPLC	Umkehrphasen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
s	D-Serin
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (Solid Phase Peptide Synthesis)
tBu	<i>tert</i> -Butyl-
TBTU	<i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium tetrafluoroborat <i>N</i> -Oxid
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
TIS	Triisopropylsilan
Tmob	2,4,6-Trimethoxybenzyl
TOCSY	vollständige Korrelationspektroskopie (Total Correlation Spectroscopy)
Trt	Trityl
*Tyr	¹³ C ₁ (4)-Tyrosin
*Y	¹³ C ₁ (4)-Tyrosin
WT	Wildtyp
X	5-Fluor-Tryptophan
Z	Cyclohexylalanin

Zeichenerklärung

A_0		Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt $t = 0s$
A_{obs}		beobachtetes Fluoreszenzsignal
B		Verschiebung entlang der Ordinate
C	M	Harnstoffkonzentration
C_m	mol/l	Übergangsmittelpunkt
ΔC_p	kJ/ (mol K)	Änderung der partiellen molaren Wärmekapazität
$\Delta G_{U-N}^{25^\circ C}$	kJ/ mol	freie Enthalpie der Entfaltung bei 25°C ohne Chaotrop
ΔH_m	kJ/ mol	Reaktionsenthalpie an der Übergangstemperatur T_m
k_E	s^{-1}	Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung
$k_E^{H_2O}$	s^{-1}	Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung ohne Chaotrop
k_F	s^{-1}	Geschwindigkeitskonstante der Faltung
$k_F^{H_2O}$	s^{-1}	Geschwindigkeitskonstante der Faltung ohne Chaotrop
k_m	s^{-1}	Geschwindigkeitskonstante am C_m
k_{obs}	s^{-1}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
m	kJ/ (mol M)	Kooperativitätsmaß der Harnstoffentfaltung
m_E	kJ/ (mol M)	Steigung der Geraden für den Entfaltungsbereich
m_F	kJ/ (mol M)	Steigung der Geraden für den Faltungsbereich
m_N	mdeg/K, M^{-1}	Steigung des Signals des nativen Zustands
m_U	mdeg/K, M^{-1}	Steigung des Signals des denaturierten Zustands
r		Regressionskoeffizient
R	kJ/ (mol K)	allgemeine Gaskonstante
t	s	Relaxationszeit
T	°C, K	Temperatur
T_m	°C, K	Übergangstemperatur
y_N	mdeg	Ordinatenabschnitt der Geraden des gefalteten Zustands
y_U	mdeg	Ordinatenabschnitt der Geraden des denaturierten Zustands
λ	nm	Wellenlänge
$\tilde{\nu}$	cm^{-1}	Wellenzahl
Θ	mdeg	Elliptizität
$[\Theta]$	deg cm^2 / d mol	molare Elliptizität
$[\Theta]_{MRW}$	deg cm^2 / d mol	molare Elliptizität pro Aminosäurerest

1 Einleitung

1.1 β -Faltblatt Struktur und Design

Die β -Faltblatt-Struktur ist eines der Haupt-Sekundärstrukturelemente in Proteinen [27]. Zusammen mit anderen Elementen wie z.B. der α -Helix organisieren sie die räumliche Struktur von Proteinen und können Wechselwirkungen zu DNA, RNA und anderen Proteinen eingehen. In den letzten Jahren ist dieses Sekundärstrukturelement aufgrund seiner Bedeutung bei der Bildung krankheitsrelevanter amyloider Strukturen zunehmend auf Interesse gestoßen. Kenntnisse über die Faktoren, die Bildung und Stabilität der β -Faltblatt-Struktur beeinflussen, können daher einen wesentlichen Beitrag zum tieferen Verständnis dieser Prozesse leisten.

Das β -Faltblatt besteht aus mehreren nahezu vollständig gestreckten Peptidketten, die parallel oder antiparallel zueinander angeordnet sein können. Charakteristisch für dieses Sekundärstrukturelement sind die Wasserstoffbrückenbindungen des Peptidrückgrats, die anders als bei α -Helices zwischen Carbonyl- und -NH-Gruppen benachbarter β -Stränge ausgebildet werden. Ein einzelner Strang ist im Gegensatz zu Helices nicht stabil.

Wie die Abbildung 1.1 zeigt, weisen die Seitenketten der Aminosäuren im Faltblatt alternierend nach oben oder unten aus der Blattebene heraus.

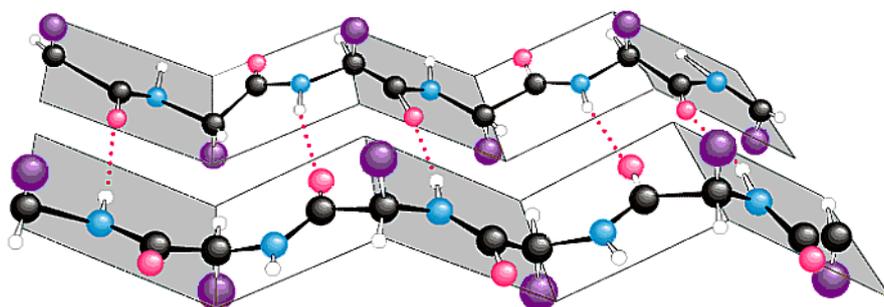


Abbildung 1.1: Schema der antiparallelen β -Faltblatt-Struktur nach Garrett & Grisham: Biochemistry 2. Ed.

Dort gehen sie Wechselwirkungen zu anderen Seitenketten und dem Peptidrückgrat der Nachbarstränge ein, die essentiell für Faltung und Stabilität sind. Die miteinander in Kontakt tretenden Reste können bei β -Faltblättern innerhalb der Peptidkette weit auseinander liegen. Im Gegensatz dazu bilden α -Helices Wechselwirkungen innerhalb einer Peptidkette aus, wobei die miteinander interagierenden Reste meist nicht weiter als vier Aminosäuren auseinander liegen [94]. Aus diesem Grund ist die Topologie der Wechselwirkungen, die die Struktur stabilisieren, für β -Faltblätter wesentlich komplexer als für α -Helices und schwieriger zu erforschen.

Die klassische Faltblatt-Struktur wurde ursprünglich als planar und flach angegeben, allerdings sind natürliche β -Strukturen rechtsgängig gewunden. Möglicherweise bedingen die Eigenschaft des Peptidrückgrats zusammen mit den Wechselwirkungen der Seitenketten diese Verdrehung [27].

Nicht nur die komplizierte Anordnung der stabilisierenden Wechselwirkungen im β -Faltblatt hat die Forschung gegenüber der heute schon weitaus besser verstandenen α -Helix behindert, sondern auch das Fehlen geeigneter Modellpeptide. Für α -Helices hat der Einsatz minimaler Strukturmodelle wesentlich zur Aufklärung der strukturstabilisierenden Kräfte beigetragen und zu gezieltem, erfolgreichem Design neuer α -helikaler Strukturen geführt [18, 93, 98, 112]. Solche Miniatursysteme haben alle Eigenschaften der größeren, komplizierteren Strukturen inne und erleichtern daher die Analyse der einzelnen Faktoren, welche zu ihren Eigenschaften beitragen [78]. Da erste β -Faltblatt-Modelle in rein wässriger Lösung häufig zu Aggregation neigten [118] oder in Ermangelung tertiärer Kontakte, wie sie in Proteinen auftreten, schlecht falteten [124], war die Erforschung dieses Sekundärstrukturelements zunächst limitiert. Erst in den letzten zehn Jahren wurden kleine, einfache Modellpeptide entworfen, die eine "isolierte" Analyse der einzelnen Einflußfaktoren auf Stabilität und Faltung ermöglichten und zu einer Reihe von neuen Erkenntnissen führten.

Statistische Studien an globulären Proteinen mit bekannter Struktur ergaben, daß bestimmte Aminosäuren in einem Strukturelement häufiger vorkommen als andere [23]. Biophysikalische Quantifizierung an β -Faltblatt-Modellen hat bestätigt, daß vornehmlich hydrophobe, β -verzweigte und aromatische Aminosäuren (V,I,T,Y,F) strukturstabilisierende Tendenz haben, während andere (G,P) sich störend auswirken [72, 65, 128]. Die einer Aminosäure innewohnende Neigung zu β -Struktur ist jedoch stark vom Kontext abhängig und wird im Wesentlichen durch sterische Faktoren [134] und abstoßende bzw. anziehende elektrostatische Wechselwirkungen benachbarter Aminosäuren beeinflusst [45]. Darüber hinaus können destabilisierende Einflüsse von ungünstigen, strukturstörenden Aminosäuren nicht durch stabilisierende Wechselwirkungen kompensiert werden [117].

Interstrang-Wasserstoffbrückenbindungen können in großen Proteinen durchaus ernstzunehmende stabilisierende Beiträge liefern, sofern sie von wässriger Umgebung abgeschirmt sind. Für kleine Sekundärstrukturmodelle ist das in deutlich geringerem Umfang zutreffend, da hier die meisten Bindungspartner auch eine zur Peptid-Peptid-Wechselwirkung isoenergetische Peptid-Wasser Interaktion eingehen können [124].

Einen erheblichen Beitrag leisten die Wechselwirkungen der Aminosäure-Seitenketten [127]. Die miteinander interagierenden Reste können sowohl diagonal als auch lateral zueinander angeordnet sein [139]. Ihre Wechselwirkungen können hydrophober oder elektrostatischer Natur sein. Viele Untersuchungen haben die Bedeutung der Interaktion von hydrophoben Aminosäuren als treibende Kraft für Faltung und Stabilität untermauert [107, 88, 36]. Elektrostatische Wechselwirkungen wie z.B. Salzbrücken zwischen Glutaminsäure und Lysin [108, 24] oder Kation- π -Interaktionen besonders zwischen Tryptophan und Arginin [146, 147] haben in einigen Fällen, trotz Solvent-exponierter Position, stabilisierenden Einfluß. Besonders letztere sind, wie auch rein aromatische Wechselwirkungen, von besonderen geometrischen Voraussetzungen abhängig.

Die Auswirkung verschiedener Loopformationen auf Faltung und Stabilität von β -Haarnadel-Motiven wurde ausführlich untersucht. D-Pro-Gly Schleifen sind gegenüber der Asn-Gly Variante rigider und wirken besonders stabilisierend auf eine zweisträngige Faltblattstruktur. Pro-Gly führt zu weitgehend ungefalteten Modellen [48, 131]. De Alba et al. zeigten, daß eine Variation der Reste in der Schleife nicht nur die Konformation des Loops steuert, sondern auch das Muster der Wasserstoffbrückenbindungen im Peptidrückgrat und die Seitenkettenwechselwirkungen [31, 30] mitbestimmt.

Obwohl man an kleinen zweisträngigen β -Strukturen isoliert stabilisierende Beiträge betrachtet hat, kann ein einzelner Faktor nicht hinreichend die Stabilität dieser Modelle erklären. Die Kräfte wirken kooperativ. Es hat sich gezeigt, daß ein hydrophober Kern in der Nähe der Loopregion stärker stabilisiert, während ein mittlerer Abstand die Länge der Stränge fördert [116, 35]. Darüber hinaus sind antiparallele β -Strukturen mit Zunahme der Stranglänge bis zu einem Optimum von 7 Resten stabiler. Eine weitere Verlängerung hat keinen Einfluß mehr [132]. Die Verlängerung senkrecht zur Strangachse zu dreisträngigen und viersträngigen Modulen zeigt mit jedem Strang eine weitere Stabilisierung der Struktur, wobei eine rigidere Looparchitektur keinen Einfluß nimmt [140].

Tabelle 1.1: Design von monomeren β -Faltblatt-Strukturen

Literatur	Anzahl der Stränge	Sequenz
Ramirez-Alvarado et al. [107]	2	RGITV NGKTY GR
de Alba et al. [31]	2	IYSNP DGTWT
Maynard & Searle [87]	2	Ac-KKYTN SINGK KITVS I
Stanger & Gellman [131]	2	RYVEV pGOKI LQ-NH ₂
Cochran et al. [25]	2	SWTWE GNKWT WK
Schenk & Gellman [120]	3	VFITS pGKTY TEVpG OKILQ-NH ₂
de Alba et al. [29]	3	TWIQN GSTKW YQNGS TYIYT
Syud et al. [140]	4	CRFSE VpGKK FITCp GKTYT EVpGO KILQ-NH ₂ (als Disulfidbindung)

Aufbauend auf den stetig wachsenden Erkenntnissen über faltungsinduzierende und β -Faltblatt-Struktur-stabilisierende Einflußfaktoren wurden bereits erfolgreich zweisträngige, monomere β -Haarnadel-Motive nach dem *de novo* Design entworfen (Tabelle 1.1), die als Grundlage für das Design von drei- und mehrsträngigen β -Faltblatt-Strukturen dienten. Während die ersten Modelle jedoch nur in wässrig organischen Lösungsmitteln falteten [126] oder in rein wässriger Lösung sehr schlecht gefaltet waren [75], zeigen die in Tabelle 1.1 dargestellten Peptide in wässrigem Milieu eine klare Ausbildung von β -Struktur. Dennoch berichtet Searle M.S. [124], daß gerade mehrsträngige Modellpeptide häufig im Gleichgewicht mit partiell gefalteten Spezies zu stehen scheinen. Dagegen zeigen kleine Proteindomänen und Proteine wie z.B. die WW-Domänen die klare Ausbildung einer einheitlichen Struktur sowie kooperatives Verhalten während der Entfaltung.

1.2 Die WW-Domäne

WW-Domänen bilden eine Familie der kleinsten, natürlich vorkommenden, β -Faltblatt-strukturierten Proteindomänen, die typischerweise ein Länge von 35 bis 40 Aminosäuren umfassen [85, 55]. Sie sind nach zwei hochkonservierten Tryptophanen (W) benannt, die in einem Abstand von 20 bis 22 Aminosäuren in der Sequenz zueinander positioniert sind [11]. Ähnlich der Src-homologen Domänen 3 (SH3-Domänen) erkennen und binden WW-Domänen Prolinreiche Sequenzen [155]. Diese kompakten Motive falten in eine monomere, antiparallele, rechts verkrümmte, dreisträngige β -Faltblatt-Struktur ohne Hilfe von Disulfidbindungen, assoziierten Liganden oder Cofaktoren [84]. WW-Domänen sind in Organismen unterschiedlichster Entwicklungsstufen in einer Vielzahl von Struktur-, Signal- und regulatorischen Proteinen aus Zytoplasma und Zellkern identifiziert worden [136]. Vertreter sind beispielsweise das Transmembranprotein CD45AP [89], der Signalstansduktionsfaktor YAP65 (YES assoziiertes Protein) [136], die Zytoskeletkomponenten Dystrophin und Utrophin [11], Ubiquitin Proteinligasen wie NEDD-4 [133], die Zellkernproteine Pin1/dodo, FE65 und Prp40 sowie die Formin- bindenden Proteine (FBPs) [19, 6].

Durch WW-Domänen vermittelte Komplexe zogen in den vergangenen Jahren einige Aufmerksamkeit auf sich, da sie in Signalschritte involviert sind, die direkt oder indirekt mit einer Vielzahl von Humanerkrankungen in Verbindung gebracht werden können. Dazu zählen die Alzheimer Krankheit [113, 82], Chorea Huntington [99], die Duchenne und Becker Muskeldystrophie [111], das Liddle Syndrom [133, 121] und nicht zuletzt auch Krebs [135, 7]. Die Ligandbindungsstelle der Domänen formt eine flache Rinne, die hydrophobe und aromatische Reste enthält [84, 56]. Diese Reste interagieren direkt mit dem Kernbereich des Liganden, während die Rinne angrenzende Aminosäuren maßgeblich für die Ligandspezifität sind. Die WW-Domänen lassen sich basierend auf ihrer Bindungsspezifität zunächst in zwei große Gruppen einteilen. Die Motive, die Phosphoserin oder -threonin (poS/ poT)- Liganden binden und Domänen, die eine Sequenz aus zwei aufeinanderfolgenden Prolinen gefolgt von einem die Spezifität definierenden Aminosäurerest, hier als Y dargestellt, (PPxY) erkennen [137]. Die zweite Gruppe wurde anschließend in einem verfeinerten Modell in die fünf Unterklassen Y-, L-, Poly-P-Gruppe und zwei unterschiedliche Arginin enthaltende Motive unterteilt [97]. Die Bindung der Prolin-reichen Liganden an WW-Domänen ist typischerweise schwach mit Dissoziationskonstanten für WW-Ligand-Komplexe, die im μM bis sub- μM Bereich angesiedelt sind.

Aufgrund ihrer geringen Größe und der kompakten Faltung stellt die WW-Domäne gleichfalls ein attraktives Modell zur Untersuchung von Proteinstabilität und -faltung dar. Die bisher

untersuchten Varianten YAP65 WW, Pin WW und FBP28 WW zeigen einen reversiblen, kooperativen Entfaltungsverlauf nach dem Zwei-Zustands-Prinzip [74, 73, 62, 83]. Ausführliche Mutationsstudien an verschiedenen Domänen haben gezeigt, daß diese Modellpeptide eine hohe Toleranz gegenüber der Substitution von Aminosäure-Seitenketten in vielen Position aufweisen [62]. Jedoch sind einige hoch- und semi-konservierte Aminosäurereste essenziell für die Stabilität bzw. Ligandbindung. Ein Austausch der Tryptophane gegen Phenylalanin resultiert für den N-terminalen Rest in einer dramatischen Reduktion der Stabilität. Dagegen bewahrt der Austausch des C-terminalen Tryptophans zwar eine stabil gefaltete Domäne, allerdings wird die Fähigkeit der Ligandbindung von YAP65 WW dadurch aufgehoben [73]. Die typische Konformation der WW-Domänen wird maßgeblich von 2 separaten hydrophoben Clustern stabilisiert [83, 62]. Die Orientierung der beteiligten Aminosäurereste (gelb) ist am Beispiel der FBP28 WW-Domäne in Abbildung 1.2 gezeigt. Diese Positionen sind besonders in Strang 2 konserviert.

Demgegenüber steht die hohe Mutationstoleranz der Loop 1 Region, vielmehr haben Untersuchungen an der Pin WW Domäne gezeigt, daß das Einbringen von Aminosäurekombinationen wie D-Pro-Gly oder Asn-Gly, die bevorzugt Typ II' bzw. I' β -Schleifen bilden, nicht zu dramatischen Stabilitätsverlusten führt. Selbst die Integration eines rigiden Dibenzofuran-Moduls verringert die Stabilität lediglich um 10 °C [69].

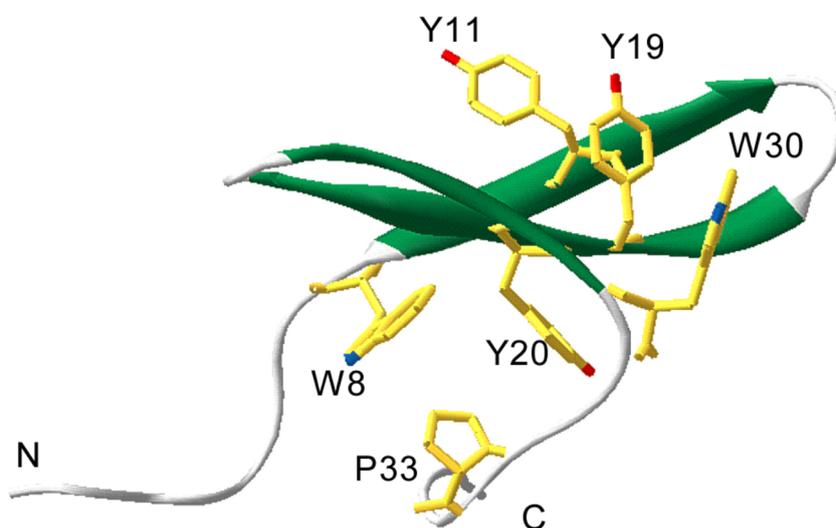


Abbildung 1.2: NMR Struktur von FBP28 WW nach Macias et al. 2000 (PDB Code: 1E0L)

Die Faltung von WW-Domänen verläuft nach einem einfach-exponentiellen Prozeß und folgt ebenfalls dem Zwei-Zustands-Prinzip. Ihre Vertreter weisen für β -Faltblatt-Strukturen sehr

hohe Faltungsgeschwindigkeiten auf mit Halbwertszeiten bis zu $17 \mu\text{s}$ für die schnellste Mutante [26, 40]. Im Vergleich dazu wurde die Geschwindigkeitsgrenze für β -Struktur-Faltung bei ca $5 \mu\text{s}$ angenommen, während sich Loop-Strukturen meist in weniger als $0,1 \mu\text{s}$ falten. Die Geschwindigkeitsgrenze für die Ausbildung von kleinen α -Helix-Strukturen liegt mit $0,5 \mu\text{s}$ etwa eine Größenordnung darunter [77]. Eine ausführliche ϕ -Wert-Analyse an Pin WW [62] und die Substitution der Peptidbindung durch eine flexiblere Thioether-Bindung in den zwei Loop-Regionen von YAP65 WW [41] haben gezeigt, daß die Formation des Loop 1 bei moderaten Temperaturen maßgeblich die Geschwindigkeit des Faltungsprozesses dieser Domänen kontrolliert, wobei Loop 1 bereits im Übergangszustand geordnet vorliegt, während Loop 2 und β -Strang 3 noch ungeordnet sind. Das initiale Ereignis in der Faltung von WW-Domänen ist demnach die frühe Strukturierung der ersten beiden Stränge, während alle anderen Teile sich erst später formieren. Die Schlüsselaminosäuren der beiden hydrophoben Cluster spielen dabei eine untergeordnete Rolle und bedingen im Wesentlichen die thermodynamische Stabilität.

Molekulardynamik-Simulationen an YAP65 WW und FBP28 WW [58, 41] beschreiben ebenfalls, daß sich unter Entfaltungsbedingungen zuerst β -Strang 3 löst, während das Haarnadelmotiv aus β -Strang 1 und 2 zunächst bestehen bleibt.

Der Einfluß der Wasserstoffbrückenbindungen im Peptidrückgrat von Pin WW wurde über einen Austausch der Amid- durch Esterbindungen untersucht [32]. Besonders dramatisch zeigt sich hierbei der destabilisierende Effekt eines fehlenden Donors in hydrophober, Solvent-abgewandter Umgebung, während die Akzeptoren unabhängig von der Umgebung kaum Einfluß haben. Die ϕ -Wert-Analyse bestätigt hierbei die Ergebnisse aus den Mutationsstudien der Seitenketten. Loop 1 ist maßgeblich für die Faltung verantwortlich, während die Stabilität der Domäne weitestgehend von hydrophoben Seitenketten-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen im hydrophoben Cluster realisiert wird.

Die Sequenzvielfalt innerhalb der WW-Familie bei gleicher räumlicher Struktur zusammen mit der Verfügbarkeit von Informationen bezüglich Struktur und Stabilität einiger Domänen haben Forscher zum Design neuer oder stabilerer Vertreter inspiriert. Basierend auf der Häufigkeitsverteilung, mit der Aminosäuren in allen Positionen auftreten, in Kombination mit dem Netzwerk konservierter, weitreichender Seitenkettenkontakte wurde ein WW-Prototyp entwickelt [83], der die charakteristischen Eigenschaften dieser Module aufweist und hinreichend stabil ($T_m = 44^\circ\text{C}$) ist. Ein anderer Ansatz verfolgte einen gezielten Austausch von Aminosäure-Seitenketten durch einen Vergleich der Sequenzhomologie von WW-Domänen mit der strukturellen Anordnung der Reste. Das Einbringen von drei Mutationen bewirkte eine Erhöhung der Temperaturstabilität von YAP65 WW um 28°C [63].

1.3 Chemische Synthese von Proteinen

Die von Merrifield entwickelte Festphasenpeptidsynthese (SPPS) [90] findet auch im Zeitalter der Herstellung rekombinanter Proteine und Proteindomänen Anwendung. Ihre Vorteile liegen einerseits bei der Herstellung cytotoxischer Sequenzen, andererseits lassen sich auf diesem Weg nicht-natürliche Aminosäuren oder andere chemische Bausteine integrieren, welche beispielsweise die Halbwertszeit peptidabgeleiteter Pharmaka erhöhen, oder die Untersuchung einzelner Aspekte der Peptid-Stabilisierung und -Faltung ermöglichen. Über lineare SPPS können heute Peptidsequenzen und kleine Proteine bis zu 60 Aminosäuren Länge synthetisiert werden und sogar Proteine sind über Fragmentkondensation mittels chemischer Synthese zugänglich. Das Prinzip der Festphasensynthese ist in Schema 1.3 dargestellt.

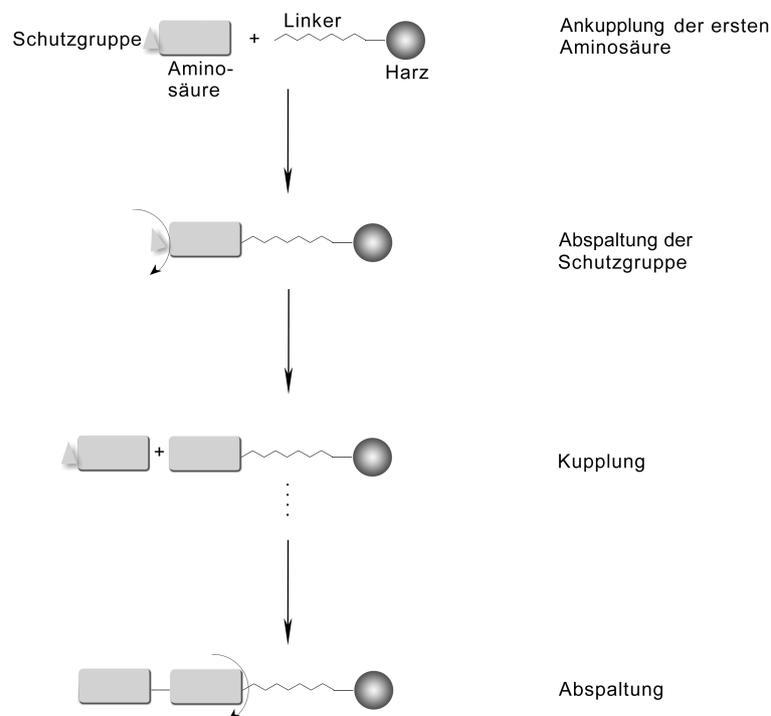


Abbildung 1.3: Schema der SPPS

Dazu wird die C-terminale Aminosäure über einen Linker mit dem Syntheseharz verknüpft. Um unerwünschte Reaktionen der Seitenketten- und der N^α -Aminofunktion zu vermeiden, sind beide geschützt. Danach wird die N^α -Aminoschutzgruppe abgespalten und die nächste Aminosäure durch Knüpfung der Peptidbindung angekuppelt, wobei die Kupplung entweder über eine Voraktivierung der Carboxyl-Gruppe der N^α -geschützten Aminosäure z.B. zum symmetrischen Anhydrid oder *in situ* in Gegenwart von Kupplungsreagenzien des Guanidi-

niumtyps erfolgen kann [14, 43]. So wird die gesamte Sequenz von C- zu N-Terminus schrittweise aufgebaut und kann anschließend vom Harz abgespalten werden. Es haben sich im Wesentlichen zwei Synthesestrategien durchgesetzt, die von Merrifield benutzte, säurelabile Boc/Bzl Methode und die basenlabile Fmoc/ tBu Methode, die eine orthogonale Schutzgruppenstrategie darstellt. Letztere erlaubt eine Synthese unter wesentlich milderen Bedingungen.

β -Faltblatt-Strukturen zählen häufig zu den schwierig synthetisierbaren Sequenzen, sogenannte "difficult sequences" oder auch "difficult peptides". Diese Peptide neigen schon während des schrittweisen Aufbaus der Peptidkette in organischem Lösungsmittel am Harz zu intra- und intermolekularer Aggregation. Wahrscheinlich sind die Ausbildung von Wasserstoffbrücken (β -Faltblatt) [71, 103] und die Wechselwirkungen der hydrophoben Seitenketten-Schutzgruppen [5] für die schlechte Solvatation der voll geschützten Peptidkette verantwortlich. Als Folge davon sind ein Schrumpfen des Harzes, geringere Zugänglichkeit von Reagenzien sowie ein variierender Grad an sterischer Hinderung am Peptid Amino-Terminus [57] beobachtet worden. Das kann zu unvollständiger Acylierung oder Abspaltung der N^α -Schutzgruppe führen [70, 79], nicht selten werden Kettenabbrüche oder Fehlsequenzen beobachtet. Die Produktausbeuten sind gering und eine Reinigung der Rohpeptide (mit hohem Nebenproduktanteil) ist sehr aufwendig. Das Phänomen der schwierigen Sequenzen ist seit mehr als dreißig Jahren bekannt. Seitdem wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, um diese Peptide der chemischen Synthese zugänglich zu machen.

Zunächst wurden vor allem Reaktionsbedingungen variiert. Hierbei wurden der Einfluß des Lösungsmittels [42] chaotroper Salze [148], geringerer Harzbeladung [143] sowie erhöhter Temperatur [142] auf die Kupplungs- und Deblockierungseffizienz untersucht. Syntheseprobleme können sowohl mit Fmoc-Chemie als auch mit der Boc-Merrifield-Methode beobachtet werden [71, 4]. Eine Modifizierung der Boc-Methode durch *in situ* Neutralisation der verbleibenden Trifluoressigsäure (TFA) führte zu einer signifikanten Reduktion der aggregationsbedingten Nebenprodukte [122]. Die *in situ* Neutralisation wurde anschließend erfolgreich auf die Fmoc-Synthese übertragen, wobei vor der Kupplung ein Waschschriff mit Säure integriert wurde [8, 114]. Die signifikante Verbesserung der Synthese wurde auf die Eigenschaft der Säure als Amid- Wasserstoffbrücken zerstörendes Agens zurückgeführt. Dennoch besteht bei der Fmoc-Strategie durch das Waschen mit Säure die Gefahr, einen Teil des Peptides vom Harz abzuspalten, sowie die säurelabilen Schutzgruppen partiell zu deblockieren. Dadurch kann die Ausbeute und die Reinheit des Rohproduktes vermindert werden.

Ein zweiter Ansatz verfolgte Modifikationen an der Peptidkette. Die einzelnen Strategien sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

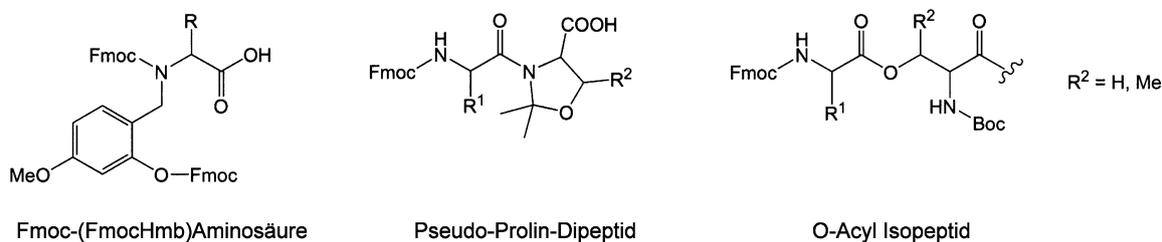


Abbildung 1.4: Strategien für die Synthese von schwierigen Sequenzen

Vorangehende Untersuchungen haben gezeigt, daß die Strangassoziation einer Polyalanin-Sequenz erfolgreich durch eine als "Gast" eingefügte sekundäre Aminosäure wie Prolin oder Sarcosin unterdrückt werden konnte [91, 9]. Prolin und Sarcosin bilden keine inter- und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung aus. Dieses Prinzip wurde durch das Einbringen von temporären, sperrigen Amidschutzgruppen wie z.B. der 2-Hydroxy-4-methoxybenzyl (Hmb-) Gruppe [64] ergänzt. Die Hmb-Schutzgruppe stört ebenso wie die oben genannten Aminosäuren die Strukturbildung für bis zu sechs nachfolgende Aminosäurereste und trägt durch verbesserte Solvatisierung des vollgeschützten Peptids wesentlich zum Erfolg der Synthese bei. Die Ankupplung einer Aminosäure an N^α -substituierte Hmb-Aminosäuren ist jedoch sterisch anspruchsvoller als die Acylierung von primären Aminen und ist insbesondere für β -verzweigte Seitenketten schwierig. Die Kupplung wird jedoch über die Acylierung der Hydroxylfunktion unter anschließender Ausnutzung eines intramolekularen $O \rightarrow N$ Acyltransfers unterstützt [115].

Die in Manfred Mutters Labor entwickelten Pseudo-Prolin-Bausteine [47, 152] verfolgen einen ähnlichen Ansatz. Hierbei werden von Serin, Threonin und Cystein abgeleitete Oxazolidin- bzw. Thiazolidin-Dipeptid-Einheiten in die entsprechende Stelle integriert. Neben der Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen zu unterdrücken, induzieren Pseudo-Proline ebenso wie Prolin einen "Knick" in der Aminosäurekette und stören die Assoziation des Stranges für die nachfolgenden sechs Reste. Das Einbringen dieser Dipeptid-Derivate ist im Vergleich zum Einsatz von Hmb wesentlich einfacher, jedoch ist für die Anwendung von Pseudo-Proline das Vorkommen von Serin, Threonin oder Cystein in der Sequenz essentiell. Ebenso wie Hmb lassen sich die Pseudo-Proline bei der abschließenden Deblockierung mittels TFA spalten.

Eine erst kürzlich veröffentlichte Strategie verfolgt die Herstellung von O-Acyl-Isopeptiden [130]. Nach Ende der Synthese kann das Depsipeptid unter schwach alkalischen Bedingungen über intramolekulare O→N Acylmigration wieder in die N-Acyl-Form umgewandelt werden. Vorteilhaft ist nicht nur die gute Löslichkeit der Depsipeptide sondern die O-Acyl-Isoform kann, im Gegensatz zu den zuvor vorgestellten Methoden, zur Erleichterung der Reinigung und Analytik genutzt werden. Besonders für stark zur Assoziation neigende Sequenzen wie z.B. Amyloid- β (1-42) konnten auf diesem Weg erheblich verbesserte Synthese- und Reinigungseigenschaften erwirkt werden [129, 17].

2 Zielsetzung der Arbeit

Stabilisierungsfaktoren von β -Faltblatt-Strukturen sind, im Gegensatz zu α -helikalen Strukturen, noch wenig aufgeklärt. Bisher gibt es nur wenige Beispiele für ein erfolgreiches Design von Faltblatt-Strukturen. In den meisten Fällen falten diese Peptide jedoch nur in oder unter Zusatz von organischen Lösungsmitteln, bzw. sie zeigen in wässriger Lösung niedrige Stabilität. Im Gegensatz dazu stellen WW-Domänen mit typischerweise 38-40 Aminosäuren kleine, kompakte, Faltblatt-strukturierte, natürliche Domänen mit hoher Stabilität dar. Aufgrund ihrer Toleranz für Aminosäure-Substitutionen in vielen Position sind sie sehr gut als Modellpeptide geeignet.

In dieser Arbeit soll anhand der FBP28 WW-Domäne das strukturstabilisierende Zusammenspiel benachbarter Aminosäure-Seitenketten studiert werden. Um auch die Integration nicht-natürlicher Aminosäure-Bausteine zu ermöglichen, sollen die Varianten über chemische Synthese nach Merrifield hergestellt werden. Da β -Struktur-bildende Peptide auch unter Synthesebedingungen zur Assoziation neigen, sind derartige Synthesen ("difficult sequences") häufig mit großen Schwierigkeiten verbunden. Aus diesem Grund soll zunächst eine Synthesemethodik erarbeitet werden, mit deren Hilfe anschließend eine Reihe von FBP28 WW-Varianten nach dem gleichen Schema zügig durch automatisierte Festphasenpeptidsynthese hergestellt werden können.

Die Vorteile der FBP28 WW-Domäne liegen in der selbst für Vertreter dieser Familie hohen Stabilität ($T_m = 64^\circ\text{C}$) und der Verfügbarkeit von Strukturdaten, mit deren Hilfe gezielt Veränderungen im Netzwerk der Wechselwirkungen vorgenommen werden können. Im Gegensatz zu bereits in der Literatur beschriebenen Arbeiten sollen nicht nur Synergien von Seitenkettenpaaren, sondern von zwei, drei bis zu fünf miteinander interagierenden Aminosäuren gleichzeitig verändert und studiert werden, wobei auch der Beitrag von Glutamin-Seitenketten untersucht werden soll. Um den stabilisierenden Anteil von ausgewählten aromatischen Seitenketten zu untersuchen, die in den zwei hydrophoben Clustern lokalisiert sind, sollen diese durch nicht-natürliche Aminosäure-Bausteine ausgetauscht werden.

Die Einflüsse der Mutationen sollen durch biophysikalische Methoden, wie z.B. Circular Dichroismus und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, quantifiziert und strukturell charakterisiert werden. Abschließend sollen ausgewählte Mutanten auf ihre Faltungskinetik hin untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Aceton	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
ACN	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Chloroform	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure	Sigma, St. Louis (USA)
DCM	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Deuteriumoxid	Euriso-Top, Gif-Sur-Yvette (Frankreich)
DIC	Fluka, Buchs (Schweiz)
DIEA	Fluka, Buchs (Schweiz)
Diethylether	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Dinatriumhydrogenphosphat	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Dioxan	Fluka, Buchs (Schweiz)
Di- <i>tert</i> -Butyl Dicarbonat	Fluka, Buchs (Schweiz)
DMAP	Fluka, Buchs (Schweiz)
DMF	Fluka, Buchs (Schweiz)
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Essigsäureanhydrid	Fluka, Buchs (Schweiz)
Ethylacetat	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Fmoc-Cl	Fluka, Buchs (Schweiz)
Fmoc-OSu	Novabiochem, Darmstadt
Harnstoff	Fluka, Buchs (Schweiz)
HBTU	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz
HOBt	Fluka, Buchs (Schweiz)
Magnesiumsulfat wasserfrei	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)

Methanol	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat wasserfrei	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Natriumchlorid	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	VEB Laborchemie, Apolda
Natriumsulfat	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
NMI	Fluka, Buchs (Schweiz)
NMP	Riedel-deHaen, Seelze
Phenol	Riedel-deHaen, Seelze
Piperidin	Aldrich, Steinheim
TFA	Riedel-deHaen, Seelze
TFE	Fluka, Buchs (Schweiz)
TIS	Fluka, Buchs (Schweiz)

N-[(1*H*-benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylen]-*N*-methylmethanaminium tetrafluoroborat *N*-Oxid (TBTU) sowie 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol (HOAt) entstammten der hauseigenen Herstellung durch B. Schmikale, *N*-[(dimethylamino)(1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridin-1-yl)methylen]-*N*-methylmethanaminium hexafluorophosphat *N*-Oxid (HATU) wurde von Peter Henklein (Institut f. Biochemie der Charité, Berlin) bezogen.

3.1.2 Aminosäure-Derivate und Synthescharze

Fmoc-Ala-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-(FmocHmb)Ala-OH	Novabiochem, Darmstadt
Ala- β -Naphthylamid	Sigma, Steinheim
Fmoc-Ala-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-Asn(Trt)-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-Cha-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-Gln(Trt)-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-Glu(OtBu)-Ser($\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-Gly-OH	Novabiochem, Darmstadt

3 Material und Methoden

Fmoc-(FmocHmb)Gly-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-Leu-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-Phe-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-Pro-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-D-Pro-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-Ser(tBu)-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-D-Ser(tBu)-OH	Novabiochem, Darmstadt
Boc-Thr-OH	Novabiochem, Darmstadt
Bsmoc-Thr(tBu)-OH	Oryza Laboratories, Chelmsford (USA)
Fmoc-Thr(tBu)-OH	Novabiochem, Darmstadt
Fmoc-Trp(Boc)-OH	Novabiochem, Darmstadt
H-Trp(1-Me)-OH	Aldrich, Steinheim
H-Trp(5-F)-OH	Fluka, Buchs (Schweiz)
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Novabiochem, Darmstadt
H- $^{13}\text{C}_1(4)$ Tyr-OH	Cambridge Isotope Laboratories, Andover (USA)
Fmoc-Val-OH	Novabiochem, Darmstadt
TG-SAc (0,24 mmol/g)	Rapp Polymere, Tübingen
TG-SRam (0,27 mmol/g)	Rapp Polymere, Tübingen
TG-RRam (0,20 mmol/g)	Rapp Polymere, Tübingen
TG-STrt-OH (0,25 mmol/g)	Rapp Polymere, Tübingen

Dnbs-Thr(Bzl)-OH wurde von Petra Henklein bzw. M. Beyermann synthetisiert, die Derivatisierung wurde von A. Klose durchgeführt. Fmoc-(Dcpm)Ala-OH wurde von L.A. Carpino (Institut f. Chemie der Universität Massachusetts, USA) zur Verfügung gestellt.

Soweit nicht explizit angegeben wurden alle Aminosäuren in ihrer L-Form eingesetzt.

3.2 Methoden

3.2.1 Automatisierte Peptidsynthese

Die Synthese der FPB28 WW-Domäne und ihrer Varianten wurde überwiegend an einem ABI 433A Peptidsyntheseautomaten (Applied Biosystems, Foster City, USA) mittels Festphasensynthese [90] durchgeführt. Dabei wurde das FastMoc 0.25 Ω MonPrevPk des Herstellers für Fmoc-Strategie [20] angewandt. Als Kupplungsreagenz wurde TBTU/ HOBt bzw. HBTU/ HOBt verwendet und es wurde meist 0,5g Syntheseharz zur Synthese eingesetzt. Alle Syntheseschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

TentaGel-SAc Harz mit einer Beladung von 0,24 mmol/g wurde benutzt, um eine Peptidsäure zu erhalten. Die Anesterung an das Harz erfolgte über DIC/NMI Methode in DCM (10 ml) 1 x 3 h bzw. für Depsi-Peptide 2 x 2 h. Dabei wurden 470 mg Fmoc-Lys(Boc)-OH (5 eq, 1mmol), 156 μ l DIC (5 eq, 1 mmol) sowie 68 μ l NMI (4 eq, 0,8 mmol) eingesetzt.

Mit Ausnahme von WW-WT wurden alle in den Stabilitätsstudien genutzten Peptide als Peptidamide am Tentagel-SRam Harz (Beladung: 0,27 mmol/g) bis zur Sequenz 5-37 hergestellt. Die Ankupplung der Aminosäurereste 1-4 erfolgte manuell über HATU in NMP (Kapitel 3.2.2).

Nach der Synthese wurden die Peptide mit einem Cocktail aus 8,3 ml TFA, 1 g Phenol, 700 μ l TIS 3 h unter Rühren von Trägerharz abgespalten und gleichzeitig entschützt. Danach wurden die Peptide in Diethylether gefällt, gewaschen und aus 10% Essigsäure lyophilisiert.

3.2.2 Manuelle Peptidsynthese

Zur Optimierung der Synthesebedingungen für WW-Domänen sowie zum Anknüpfen der Aminosäurereste 1-4 wurden einige Synthesen bzw. Syntheseschritte manuell bei Raumtemperatur durchgeführt. Standardmäßig wurden für die Kupplung Guanidiniumsalze [14] wie TBTU bzw. HBTU eingesetzt.

Zum Ankuppeln der N-terminalen Aminosäuren 1-4 (G,A,T,A) der FBP28 WW-Analoga wurde statt TBTU das leistungsfähigere Reagenz HATU [13] verwendet. Diese Reaktionen wurden als Doppelkupplung in dem polareren Lösungsmittel NMP durchgeführt.

Die Ankupplung von Aminosäuren an Hmb-geschützte Reste konnte über DIC/HOBt (Doppelkupplung über Nacht) erreicht werden.

Die Vollständigkeit der Kupplungen wurden gegebenenfalls über die Ninhydrinreaktion freier primärer Amine (Kaisertest)[66] oder über die Menge an freigesetztem Dibenzofulven bei der Fmoc-Abspaltung (Beladungsbestimmung) überprüft. Bei potentiell unvollständigen Kupplungen wurde acetyliert.

Für Ansätze in großem Maßstab wurde 0,5 g - 1 g Harz eingesetzt, während Ansätze zur gezielten Untersuchung der Synthese einzelner Sequenzabschnitte in kleinerem Maßstab mit typischerweise 20 mg - 50 mg Harz durchgeführt wurden.

Die Abspaltung vom Harz erfolgte wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, wobei für den kleinen Maßstab die Reagenzmenge auf insgesamt 1 ml reduziert wurde.

Nachfolgend sind alle genannten Syntheseschritte detailliert aufgeführt.

Kupplung mit Guanidiniumreagenzien:

Fmoc-Aminosäure	5 eq (0,4 M)
TBTU, HBTU bzw. HATU	5 eq (0,4 M)
DIEA	10 eq (0,8 M)

in DMF bzw. NMP 1 x oder 2 x 30 min

Kupplung mit DIC/HOBt:

Fmoc-Aminosäure	7 eq (0,5 M)
DIC	7 eq (0,5 M)
HOBt bzw. HOAt	7 eq (0,5 M)

Mischung in DCM 5 min voraktiviert, danach zum Harz pipettiert und ohne Base über Nacht gekuppelt.

Kupplung über symmetrisches Anhydrid:

Fmoc-Aminosäure	6 eq (0,2 M)
DIC	3 eq (0,1 M)

in DCM 5 min voraktiviert, danach zusammen mit 2 eq (0,065 M) DMAP zum Harz pipettiert, 30 min gerührt und weitere 2 h in Ruhe weiter reagiert.

Kupplung von Dnbs-Thr(Bzl)-Cl:

Dnbs-Thr(Bzl)-Cl	5 eq (0,4 M)
------------------	--------------

in DMF insgesamt 3 h

Entstehende Salzsäure wurde schrittweise alle 30 min mit DIEA (1 eq, 10 μ mol, kleiner Maßstab) neutralisiert.

Acetylierung:

DMF	7 ml
Essigsäureanhydrid	2 ml (2 M)
DIEA	1 ml (0,58 M)

1 x 15 min

Die Volumina sind hier exemplarisch für 1 g Synthescharz angegeben.

Für kleinere Harzmengen wurde der Ansatz entsprechend verringert.

Anesterung und Capping der freien Hydroxy-Funktion für Depsi-Peptide:

Fmoc-Aminosäure, Essigsäureanhydrid	5 eq (0,1 M)
DIC	5 eq (0,1 M)
NMI	4 eq (0,08 M)

in DCM 2 x 2h

Fmoc Deblockierung:

20% Piperidin/ DMF

1 x 5 min und 1 x 10 min

Für den großen Maßstab wurden je 10 ml Lösung eingesetzt und

für den kleinen Maßstab je 1 ml Lösung zur Deblockierung verwendet.

Kaisertest:

Zum Test auf primäre Aminogruppen wurden einige wenige Harzkügelchen entnommen und in Ethanol gewaschen. Danach wurden 100 μ l Ninhydrinlösung (50 mg/ ml Ninhydrin in Ethanol) mit 100 μ l einer wässrigen KCN- Lösung (2% einer 10 mM wässrigen KCN Lösung in Pyridin) zusammen mit dem Harz vermischt und 5 min bei 120°C erhitzt. Eine dunkelblaue Verfärbung zeigte sich bei der Existenz von primären Aminen und deutete auf eine unvollständige Kupplung hin.

Beladungsbestimmung:

Eine Beladungsbestimmung wurde durchgeführt, um die Menge der angekuppelten Aminosäure zu bestimmen. Dazu wurde die Fmoc-Gruppe in einem genau definierten Volumen an Lösungsmittel abgespalten. Für 1 g eingesetztes Harz wurden typischerweise insgesamt 20 ml 20% Piperidin/ DMF eingesetzt. Die Lösung wurde aufgefangen und photometrisch bei 301 nm gegen Piperidin/ DMF als Leerwert gemessen. Die Berechnung der Beladung erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

3.2.3 Herstellung von Dcpm-Ala-Ala- β -Naphthylamid

Zur Herstellung dieses Modellpeptids wurden 20 mg Fmoc-(Dcpm)Ala-OH (1 eq, 0,05 mmol) und 19 mg HATU (1 eq, 0,05 mmol) mit 32 mg Ala- β -Naphthylamid (3 eq, 0,15 mmol) in 300 μ l DCM gelöst und nach Zugabe von 17 μ l DIEA (2 eq, 0,1 mmol) 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde über analytische HPLC geprüft. Überschüssiges Ala- β -Naphthylamid sowie nichtreagiertes Fmoc-(Dcpm)Ala-OH wurde sauer bzw. alkalisch mit 0,01 N Salzsäure bzw. 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung ausgewaschen. Die Produktlösung in DCM wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und bis zur Trockene einrotiert. Das Dipeptid wurde in 100 μ l DCM gelöst und die Fmoc-Gruppe wurde mit etwa 50 μ l Piperidin 10 min deblockiert. Das Produkt wurde anschließend über HPLC gereinigt und lyophilisiert.

3.2.4 Schützen von Aminosäuren

1-Methyl-Tryptophan, 5-Fluor-Tryptophan und Ring $^{13}\text{C}_1(4)$ markiertes Tyrosin konnten nicht als geschützte Derivate gekauft werden. Daher mußten vor Beginn der Peptidsynthese Fmoc- bzw. Boc-Gruppen eingebracht werden.

Einbringen der Fmoc-Gruppe:

Die N^α -Aminofunktionen wurden unter der Verwendung von Fmoc-OSu für die Tryptophan-Derivate bzw. Fmoc-Cl für das Tyrosin-Derivat entsprechend der in Houben-Weyl [54] publizierten typischen Arbeitsvorschriften geschützt.

Schützen der Tryptophan-Seitenkette:

Fmoc-Trp(5-F)-OH wurde zunächst an die Peptidkette am Harz gekuppelt, Fmoc deblockiert und die in der Sequenz nachfolgende Aminosäure angekuppelt. Danach wurde mit DCM gewaschen und die freie Seitenkette des Tryptophan mit 418 mg (19 eq, 1,9 mmol) Di-*tert*-Butyl Dicarbonat über Nacht umgesetzt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde nicht überprüft.

3.2.5 Reinigung und Charakterisierung der Peptide

Die Aufreinigung der Rohprodukte aus der Peptidsynthese wurde über Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) an einem Shimadzu System (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland) in präparativem und semipräparativem Maßstab durchgeführt.

Für WW-Domänen wurde hauptsächlich eine ProntoSIL C¹⁸-Säule (250 x 20 mm/ 300-10-C¹⁸ SH 10,0 μm ; Bischoff Analystechnik GmbH, Leonberg, Deutschland) genutzt. Es wurden 20- 30 mg Peptid in 10 ml 20% ACN/ 0,1% TFA/ Wasser über eine 10 ml-Schleife aufgetragen. Typische Trennbedingungen stellten einen Gradienten von 25- 50% Eluent B in 70 min mit einer Flußrate von 10 ml/ min bei Raumtemperatur dar, wobei Eluent A aus 0,1% TFA/ Wasser und Eluent B aus 80% ACN/ 0,1% TFA/ Wasser (v/v) bestand. Die Fraktionen wurden bei 220 nm detektiert.

Im semipräparativen Maßstab wurde eine PolyEncap-Säule (250 x 8 mm/ PolyEncap 300 A 10,0 μm ; Bischoff Analystechnik GmbH, Leonberg, Deutschland) für Peptidmengen bis 10 mg verwendet. Auch hier wurde ein Gradient von Eluent B mit einer Flußrate von 5 ml/ min eingestellt.

Die gereinigten Produkte lagen nach Synthese und Reinigung mit Trifluoressigsäure als Gegenion vor und wurden mittels analytischer RP-HPLC und Matrix-unterstützter Laserdesorption/Ionisations-Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF) charakterisiert.

Die analytische RP-HPLC wurde an einer Jasco HPLC-Anlage (Jasco Deutschland) unter Verwendung einer PolyEncap-Säule (250 x 4 mm/ PolyEncap 300 A 5,0 μm ; Bischoff Analystechnik GmbH, Leonberg, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde eine Peptidlösung von 1 mg/ ml hergestellt und davon 20 μl injiziert. Die Trennung erfolgte hier über einen Gradienten von 5- 95% Eluent B in 40 min mit einer Flußrate von 1 ml/ min. Detektiert wurde analog zur präparativen Trennung bei 220 nm.

Die Reinheit der Peptide wurde über RP-HPLC bestimmt und war für alle Peptide besser als 95%.

MALDI-TOF-MS-Analytik wurde routinemäßig an einem ABI Voyager-DE STR-Gerät (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Dazu wurden die Peptide in 50% ACN/ 0,3% TFA/ Wasser zu einer Konzentration von 0,1 mg/ ml gelöst und direkt auf dem Träger zu gleichen Teilen mit der Matrix kristallisiert. Als Matrix wurde α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure mit einer Konzentration von 5 mg /ml eingesetzt.

3.2.6 CD-Spektroskopie

Circulardichroismus-Spektroskopie wurde vorwiegend genutzt, um die einzelnen Mutanten der WW-Domänen untereinander hinsichtlich Ausprägung der β -Faltblatt-Struktur und Stabilität zu vergleichen. Die Messungen wurden in 30 mM Phosphatpuffer (pH 7,0 / Ionenstärke 150 mM) mit einer Peptidkonzentration von 50 μ M durchgeführt.

Hierzu wurden zunächst Peptidestammlösungen mit einer Konzentration von ca. 250 μ M hergestellt. Anschließend wurden ungelöste oder aggregierte Bestandteile über einen 0,45 μ m Filter abfiltriert und die Peptidkonzentration über UV-Absorption bei 280 nm bestimmt, wobei der molare Extinktionskoeffizient des jeweiligen Peptides über eine Gleichung nach Gill und von Hippel [44] abgeschätzt wurde. Die Stammlösungen wurden danach auf eine Konzentration von 50 μ M verdünnt.

CD-Spektren wurden bei 4°C für den gefalteten bzw. 95°C für den entfalteten Zustand aufgenommen. Nach der Temperaturentfaltung wurde nochmals ein Spektrum bei 4°C aufgenommen, um den Grad der Reversibilität zu ermitteln, der typischerweise zwischen 80 % und 95 % lag. Die Parameter zu den Messungen der CD-Spektren und thermischen Entfaltungskurven sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Für Q-W-Haarnadel-Motive wurde $\lambda_{max} = 227$ nm eingestellt.

Tabelle 3.1: Parameter für CD-Spektren (links) und Temperaturdenaturierung (rechts)

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Empfindlichkeit	100 mdeg	Empfindlichkeit	100 mdeg
Wellenlängenbereich	205 - 260 nm	Wellenlänge	230 nm
Meßpunktabstand	0,5 nm	Meßpunktabstand	0,2°C
Abtastgeschwindigkeit	100 nm/ min	Heizgeschwindigkeit	50°C/ h
Antwortverhalten	1 s	Antwortverhalten	8 s
Bandbreite	1 nm	Bandbreite	1 nm
Akkumulationen	14 f. Probe, 16 f. Puffer	Temperaturbereich	4 - 95°C

Aus den gemessenen Entfaltungskurven wurden zunächst die Übergangstemperatur T_m sowie die Reaktionsenthalpie am Schmelzpunkt ΔH_m über folgenden Zusammenhang [138] ermittelt:

$$y = \frac{(m_N * T + y_N) + (m_U * T + y_U) * \exp \left[\frac{T * (\frac{\Delta H_m}{T_m} + \Delta C_p * \ln(\frac{T}{T_m})) - \Delta H_m - \Delta C_p * (T - T_m)}{R * T} \right]}{1 + \exp \left[\frac{T * (\frac{\Delta H_m}{T_m} + \Delta C_p * \ln(\frac{T}{T_m})) - \Delta H_m - \Delta C_p * (T - T_m)}{R * T} \right]} \quad (3.1)$$

y gibt den Meßwert bei der eingestellten Temperatur T an. m_N und m_U sind Steigungen der Geraden für den gefalteten und denaturierten Zustand, y_N und y_U sind die Ordinatenabschnitte der Geraden. $R = 8,3145 * 10^{-3} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ist die allgemeine Gaskonstante, $\Delta C_p = 1,745 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ steht für die Änderung der spezifischen Wärmekapazität von WW-WT aufgrund der Entfaltung. Dieser Wert wurde der Literatur entnommen [40] und für alle WW-Varianten unter der Annahme eines geringen Fehlers zur Berechnung der thermodynamischen Parameter genutzt. T_m und ΔH_m sind freie Parameter für Schmelzpunkt und die Reaktionsenthalpie am Schmelzpunkt. Sie wurden zusammen mit den Parametern der Geraden durch nicht-lineare Kurvenanpassung über ein Gradientenverfahren ermittelt. Daraus errechnete sich die Änderung der freien Enthalpie der Entfaltung mit:

$$\Delta G_{U-N}^{25^\circ\text{C}} = \Delta H_m * \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p * \left[(T_m - T) + T * \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right] \quad (3.2)$$

T wurde mit 298 K eingesetzt, um die Vergleichbarkeit der Werte zu erreichen.

3.2.7 Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Harnstoff-induzierte Entfaltung der Domänen wurde über deren Tryptophanfluoreszenz an einem Aminco-Bowman SLM Lumineszenz-Spektrometer (Aminco-SLM) verfolgt. Hierzu wurden die Peptide in 30 mM Phosphatpuffer pH 7,0 (siehe CD-Experimente) gelöst, der Harnstoff in einem Konzentrationsbereich von 0 M bis 9 M enthielt. Die Peptidkonzentration für diese Messungen betrug $2 \mu\text{M}$. Die Proben wurden vor der Messung mindestens 12 h equilibriert, danach auf 25°C temperiert und zur Messung in eine $4 \times 10 \text{ mm}$ Quarzküvette pipetiert. Die Tryptophanfluoreszenz wurde bei 280 nm und einer Spaltbreite von 4 nm angeregt, die Emissionsspektren wurden von 300-450 nm mit einer Spaltbreite von 4 nm aufgenommen. Die Tryptophanfluoreszenz bei 350 nm wurde in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration aufgetragen und über eine nicht-lineare Kurvenanpassung analog der CD-Entfaltungskurven

nach folgender Zwei-Zustands-Beziehung [119] ausgewertet.

$$y = \frac{(m_N * C + y_N) + (m_U * C + y_U) * \exp\left[\frac{m*(C-C_m)}{R*T}\right]}{\left[\frac{m*(C-C_m)}{R*T}\right]} \quad (3.3)$$

Wie für die CD-Experimente steht auch hier y für den Messwert bei der eingestellten Harnstoffkonzentration C . Die Variablen m_N und m_U sind die Steigungen der Geraden des gefalteten und denaturierten Zustands, y_N und y_U sind die Ordinatenabschnitte dieser Geraden. $R = 8,3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ist die allgemeine Gaskonstante während C_m für die Harnstoffkonzentration bei halbmaximaler Entfaltung steht. Die Konstante m bezeichnet die lineare Abhängigkeit der freien Enthalpie der Entfaltung von der Harnstoffkonzentration. Dieser Parameter wurde für die Auswertung der Kurven mit $1,6 \pm 0,04 \text{ kJ/mol}$ [40] festgesetzt. Die freie Gibbsche Enthalpie der Entfaltung bei 25°C ohne Harnstoff ergab sich aus dem Massenwirkungsgesetz mit:

$$\Delta G_{U-N}^{25^\circ\text{C}} = m * C - R * T * \ln \left[\frac{[U]}{[N]} \right] \quad (3.4)$$

$[U]$ und $[N]$ sind die Anteile an gefaltetem und ungefaltetem Peptid, die am Schmelzpunkt per Definition genau gleich groß sind. Daraus ergibt sich die vereinfachte Beziehung:

$$\Delta G_{U-N}^{25^\circ\text{C}} = m * C \quad (3.5)$$

3.2.8 Temperatursprung-Experimente

Faltungskinetiken wurden für N-WW und 5QN-WW an einem Dia Log RT Temperatursprung-Meßgerät (Dia-Log, Düsseldorf) durchgeführt. Hierzu wurden die Peptidlösungen in 30 mM Phosphatpuffer mit einer Ionenstärke von 150 mM bei pH 7,0 analog der Vorgehensweise für CD-Experimente hergestellt. Der Puffer enthielt Harnstoff im Konzentrationsbereich von 0 bis 9 M und die Peptidkonzentration bei der Messung betrug $30 \mu\text{M}$. Die Proben wurden vor der Messung entgast, in eine 0,8 ml fassende Meßzelle gefüllt, dort auf $21,5^\circ\text{C}$ vortemperiert und anschließend innerhalb von $0,5 \mu\text{s}$ (unter optimalen Bedingungen) auf 25°C aufgeheizt. Dies erfolgte mittels eines 10 nF-Kondensators, der über eine elektrische Entladung von 15 kV eine sprunghafte Temperaturerhöhung von $3,5^\circ\text{C}$ in der Probe induzierte. Die Anpassung der Domänen an die neuen Bedingungen wurde über die Änderung der Tryptophanfluoreszenz bei 350 nm verfolgt. Für jede Harnstoffkonzentration wurden zwischen 10 und 50 Messungen akkumuliert, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren.

Die erhaltenen Kinetiken konnten alle nach der folgenden einfach-exponentiellen Beziehung ausgewertet werden.

$$A_{obs} = A_0 * \exp [-k_{obs} * t] + B \quad (3.6)$$

A_{obs} stellt das gemessene Signal dar, A_0 das Signal zum Zeitpunkt $t = 0s$, k_{obs} die Geschwindigkeitskonstante, t die Zeit und B die Verschiebung entlang der Ordinate. Da sich k_{obs} additiv aus der Faltungs- und Entfaltungsrates k_F und k_E ergab und diese Raten nicht einzeln gemessen werden konnten, mußten sie über eine Kurvenanpassung ermittelt werden. Dazu wurden die Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} im Chevron-Diagramm als Funktion der Harnstoffkonzentration aufgetragen und ein Zwei-Zustands-Verhalten zugrunde gelegt. Die freien Parameter k_m (Faltungsgeschwindigkeit am Mittelpunkt des Übergangs) sowie m_F und m_U wurden durch nicht-lineare Kurvenanpassung nach folgender Beziehung [61] erhalten.

$$\log_{10} k_{obs} = \log_{10} \left(\frac{k_m}{2} * \left\{ 10^{(-\frac{m_F}{R*T} * (C-C_m))} + 10^{(\frac{m_E}{R*T} * (C-C_m))} \right\} \right) \quad (3.7)$$

Ausgehend von Gleichung 3.7 errechneten sich die Faltungs- und Entfaltungsgeschwindigkeiten ($k_F^{H_2O}$ und $k_E^{H_2O}$) durch Einsetzen der Steigungen m_F und m_E sowie der Rate k_m in folgende zwei Teilbeziehungen:

$$k_F^{H_2O} = \frac{k_m}{2} * 10^{[-\frac{m_F}{R*T} * (-C_m)]} \quad (3.8)$$

$$k_E^{H_2O} = \frac{k_m}{2} * 10^{[\frac{m_E}{R*T} * (-C_m)]} \quad (3.9)$$

Die freie Enthalpie der Entfaltung wurde nach Gleichung 3.10 berechnet.

$$\Delta G_{U-N}^{25^\circ C} = -R * T \ln \left(\frac{k_E^{H_2O}}{k_F^{H_2O}} \right) \quad (3.10)$$

3.2.9 FT-IR Spektroskopie

Für einige Peptide wurde neben der CD-Spektroskopie auch FT-IR genutzt, um Aussagen über Struktur und Stabilität zu erhalten. Die synthetisierten Peptide lagen zunächst mit Trifluoracetat als Gegenion vor. Dieses Ion absorbiert im Infrarotspektrum bei 1673 cm^{-1} [49] und überlappt daher mit dem Sekundärstruktur-sensitiven Amid-I-Bereich (Amid C=O Streckschwingung) der Proteine und Peptide. Der Austausch von Trifluoracetat gegen Chlorid wurde durch dreimaliges Lyophilisieren der Peptide aus 10 mM Salzsäure erreicht.

Um die Vollständigkeit des H/D-Austausches zu gewährleisten, wurden die Peptide meist

am Vorabend der Messung in 50 mM Phosphatpuffer in Deuteriumoxid (mit 50 mM NaCl, pD 7,6) gelöst, wobei die Peptidkonzentration ca 2 mM betrug und die Peptidlösung einen pD von 6,5 annahm. Nicht gelöstes oder aggregiertes Peptid wurde vor der Messung bei 6200 rpm 5 min lang abzentrifugiert.

Für die Aufnahme der FT-IR-Spektren wurden CaF₂-Fenster mit einer Schichtdicke von 52 μm mit 9,0 μl Peptidlösung befüllt und luftdicht verschlossen. Alle Messungen wurden an einem mit einem DTGS-Detektor (deuteriertes Triglycinsulfat) ausgestatteten IFS-28/B FT-IR Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Das Gerät wurde kontinuierlich mit getrockneter Luft gespült, um störende Beiträge des atmosphärischen Wasserdampfs gering zu halten. Infrarotspektren wurden in 5°C Schritten aufgenommen, indem bei jeder Temperatur 128 Einzelmessungen automatisch zu einem Mittelwert akkumuliert und Fourier-transformiert wurden, um Spektren mit einer nominalen Auflösung von 4 cm^{-1} zu erzeugen.

Analog dazu wurden Pufferspektren erfaßt, die zur Korrektur der Peptidspektren benutzt wurden. Die Restbeiträge der Wasserdampfbanden wurden über ein zu diesem Zweck aufgenommenes Spektrum mit höherem Anteil an atmosphärischem Wasserdampf rechnerisch korrigiert.

Die Auflösung der Spektren wurde mit Hilfe einer Fourier-Entfaltung über eine Lorentz-Funktion erhöht, dabei wurde eine Halbwertsbreite von 2,4 und eine Auflösungsverstärkung von 2,1 verwendet. Danach wurde die zweite Ableitung der Spektren gebildet und der Temperaturverlauf der Amid-I-Banden für intramolekulare β -Faltblatt-Struktur (1633 cm^{-1}) sowie der Tyrosin-Bande bei 1515 cm^{-1} bzw. bei 1505 cm^{-1} für ¹³C₁(4)Tyr (Ring C-C-Streckschwingung) ausgewertet. Die thermodynamischen Parameter der Temperaturentfaltung wurden mit Hilfe der bereits im CD-Teil erwähnten Gleichungen ermittelt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Erarbeitung einer effizienten Synthesestrategie zum Aufbau von FBP28 WW-Peptiden mittels Festphasensynthese

4.1.1 Erprobung von Standardmethoden und Ursachen für das Scheitern der Synthesen

Die Entwicklung einer zuverlässigen Synthesemethode war eine Voraussetzung, um den Einfluß verschiedener Mutationen auf die Stabilität der FBP28 WW-Domäne untersuchen zu können. Obwohl die Herstellung einiger WW-Domänen und ihrer Analoga durch Proteinexpression in *E. coli* offensichtlich erfolgreich verläuft [84, 40, 62], wurde in dieser Arbeit der chemische Syntheseweg bevorzugt, da er neben der einfachen Herstellung von Mehrfachmutanten und stark destabilisierten eventuell cytotoxisch wirkenden Analoga auch den Einbau von unnatürlichen, nicht-codierten Aminosäuren ermöglicht.

Erste Versuche zur Festphasenpeptidsynthese (SPPS) der in Tabelle 4.1 abgebildeten FBP28 WW-Varianten zeigten allerdings den geringen Erfolg der Synthese nach Standard-Bedingungen.

Tabelle 4.1: Sequenzen von FBP28 WW-WT und WT-Varianten

Abkürzung	Name	Sequenz
WW-WT	FBP28 WW-WT	GATAV SEWTE YKTAD GKTY YNNRT LESTW EKPQE LK
5A-WW	A ^{9,21,23,26,28} -FBP28 WW	GATAV SEWAE YKTAD GKTY YANART AEATW EKPQE LK
5Q-WW	Q ^{9,21,23,26,28} -FBP28 WW	GATAV SEWQE YKTAD GKTY YQNQRT QEQTW EKPQE LK

In Kapitel 1.3 wurde bereits erwähnt, daß β -Faltblatt-strukturierte Peptide, wie z.B. WW-Domänen, häufig zu den "schwierigen Sequenzen" in der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) zählen. Wie die Abbildung 4.1 der analytischen HPLC-Chromatogramme von Standard Fmoc-Synthesen des WW-WT bzw. der Varianten 5A-WW und 5Q-WW zeigt, trifft das im besonderen Maße für die FBP28 WW-Domäne zu.

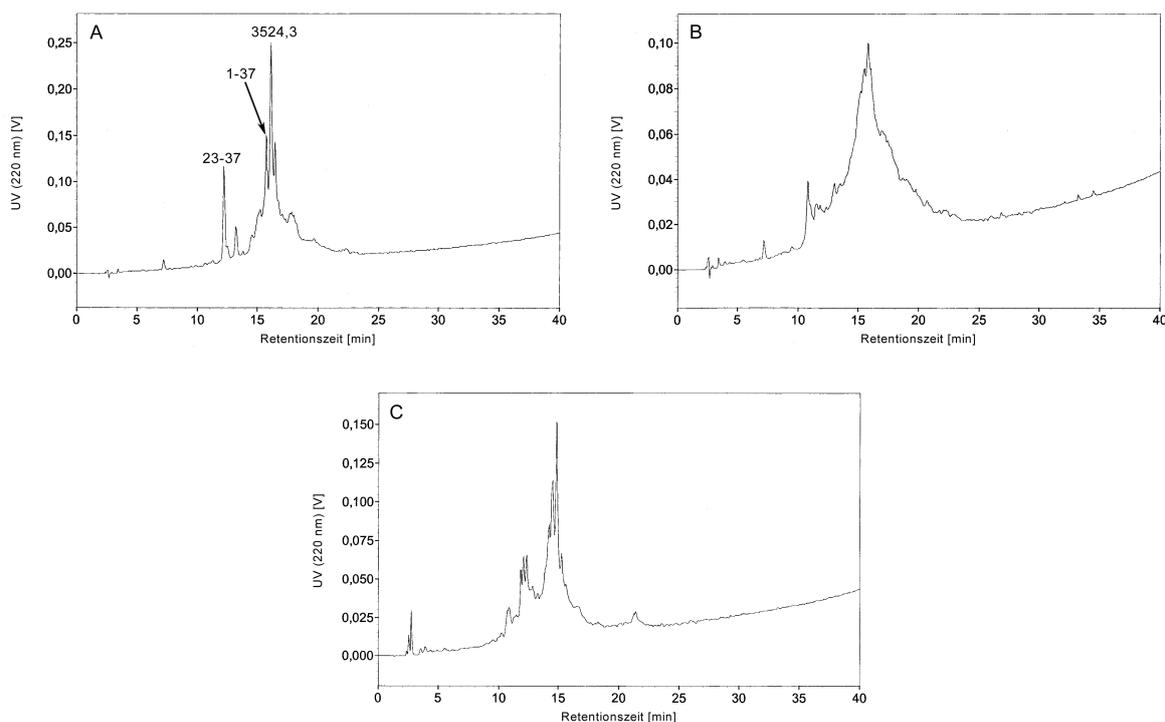


Abbildung 4.1: Standard Fmoc-Synthese am Tentagel-SAc Harz am Syntheseautomaten von (A) WW-WT und (B) 5A-WW bzw. manuell (Einfachkupplungen) von (C) 5Q-WW

Massenspektrometrische Analyse der drei Rohprodukte ergab, daß für WW-WT und 5A-WW die Kupplung von Asn²² an Asn²³ bzw. Ala²³ unvollständig verlief und die Synthese an dieser Stelle partiell abbrach. Die Zielsequenzen waren in beiden Fällen in sehr geringer Ausbeute vorhanden, jedoch lagen die Hauptprodukte im 3000er bis 4000er Massenbereich und sind wahrscheinlich auf Syntheseabbrüche in der β -Strang 1 Region zurückzuführen. Eine Vergleichssynthese der WW-WT Sequenz an verschiedenen Syntheseharzen mit Acetylierung nach jedem Kupplungsschritt (Tabelle 4.2) zeigte, daß besonders die Kupplung an Asn²³ unabhängig von dem verwendeten Syntheseharz erschwert war.

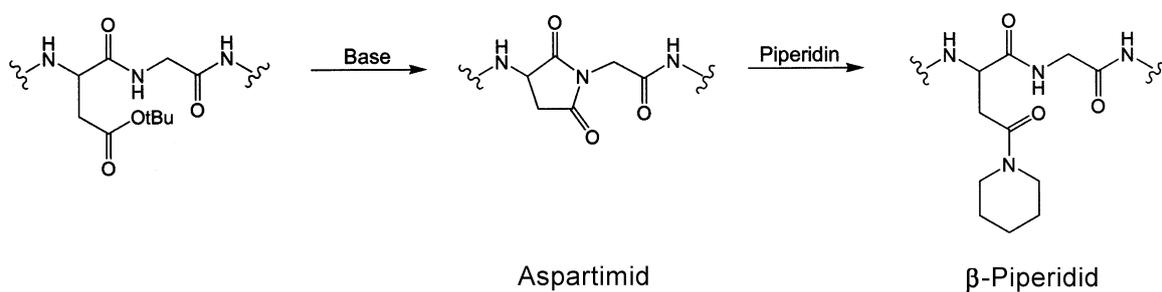
Tabelle 4.2: Vergleichssynthesen von WW-WT an verschiedenen Harzen

Aminosäure	TG-SAc	TG-RRam	TG-STrt
Lys	0,194*	0,208	-
Leu	0,193	0,200	0,232
Glu	0,183	0,185	0,228
⋮	⋮	⋮	⋮
Ser	0,174	0,116	0,166
Glu	0,165	0,112	0,163
Leu	0,168	0,119	0,150
Thr	0,166	0,098	0,141
Arg	0,153	0,091	0,134
Asn	0,114	0,081	0,119
Asn	0,063	0,045	0,067
Ausbeute ⁺	32%	22%	29%

* Beladungsbestimmung in mmol Dibenzofulven/ g Harz

⁺ bezogen auf den Ausgangswert nach Ankupplung der ersten Aminosäure

Dagegen konnte die Abbruchsequenz 23-37 in der Synthese von 5Q-WW nicht beobachtet werden, jedoch wies diese Variante einen beträchtlichen Anteil an Aspartimid und dem durch Piperidin-induzierte Ringöffnung entstehenden Piperidid in der Asp¹⁵-Gly¹⁶ Loopregion auf (Abbildung 4.2).

Abbildung 4.2: Basen-induzierte Bildung von Aspartimid und β -Piperidid nach Dölling et al. 1994 [34]

Die Bildung dieser 5-Ring-Imide ist eine häufig beobachtete Nebenreaktion, die im Wesentli-

chen bei Asp-X Sequenzen auftritt, wobei X für Gly aber auch Ser oder Thr stehen kann [96]. Darüber hinaus ist diese Nebenreaktion auch von der Konformation der Peptidkette unter Synthesebedingungen abhängig [34]. Die Syntheseoptimierung erforderte daher die Unterdrückung der Aspartimidbildung, die an der 5Q-WW Sequenz durchgeführt wurde und die Verbesserung unvollständiger Kupplungen oder Fmoc-Deblockierungen, die am Beispiel der WW-WT und 5A-WW Sequenzen erprobt wurde.

4.1.2 Verhinderung von Aspartimidbildung

Frühere Bestrebungen, Aspartimidbildung zu vermeiden, haben gezeigt, daß der Zusatz von HOBt oder von 2,4-Dinitrophenol zur Deblockierungslösung [34] sowie ein Austauschen der Base und/ oder des Lösungsmittels [33] den Anteil dieser Nebenprodukte erheblich verringert. Eine vollständige Unterdrückung der Imidbildung gelingt dagegen durch Anwendung zusätzlicher temporärer Amidschutzgruppen am Peptidrückgrat wie z.B. durch 2-Hydroxy-4-methoxybenzyl (Hmb) geschützte Aminosäurederivate [104]. Für die Synthese von 5Q-WW wurde daher Fmoc-(FmocHmb)Gly-OH in der Loop 1 Region an Position 16 eingesetzt. Die Ankupplung des nachfolgenden Fmoc-Asp(OtBu)-OH wurde zunächst über die standardmäßig eingesetzte TBTU/ DIEA-Methode (Doppelkupplung) versucht, allerdings verlief die Acylierung des sterisch gehinderten, N-alkylierten Glycins nicht vollständig. Die Ankupplung über DIC/ HOBt (Doppelkupplung) mit stark verlängerten Reaktionszeiten führte dagegen zu nahezu vollständiger Acylierung und folglich zu einem Rohprodukt mit höherer Reinheit. Die Analyse des Rohproduktes in Abbildung 4.3 zeigte, daß erwartungsgemäß die Bildung des Aspartimids bzw. des Piperidids vollständig unterbunden wurde und die Synthese ohne weitere Schwierigkeiten bis fast zum Ende verlief.

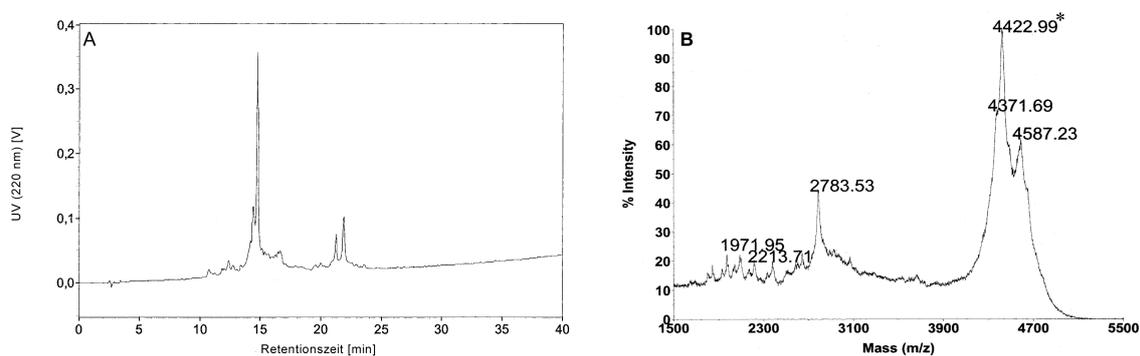


Abbildung 4.3: Synthese von 5Q-WW über Fmoc-(FmocHmb)Gly-OH in Position 16, die Ankupplung von Fmoc-Asp¹⁵(OtBu)-OH erfolgte über DIC/ HOBt; (A) analytische HPLC; (B) MALDI-TOF-MS (* markiert die Masse des Syntheseprodukts 1-37)

Die beiden HPLC-Peaks bei 21,3 min und 21,9 min Retentionszeit wiesen auf Produkte mit unvollständiger Schutzgruppenabspaltung hin und wurden massenspektrometrisch als Fmoc-1-37 und Fmoc-2-37 identifiziert. Eine erschwerte Abspaltung der N^α-Aminoschutzgruppe wird für schwierige Sequenzen häufiger beobachtet und kann möglicherweise durch Wiederholung bzw. Verlängerung der Fmoc-Spaltung mit Piperidin oder durch eine Abspaltungsreaktion mit einer stärkeren Base wie z.B. 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) erreicht werden.

Eine unvollständige Abspaltung der Hmb-Schutzgruppe wurde für diese Sequenz im Gegensatz zu Synthesen anderer FBP28 WW-Analoga, die in Kapitel 4.1.3 ausführlich dargestellt sind, nicht beobachtet. Vielmehr konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, daß sich ein Hmb-geschütztes Glycin ausgezeichnet zur Vermeidung der Aspartimidbildung eignet. Die Acylierung des (Hmb)Gly-Peptides war erwartungsgemäß durch den sterischen Anspruch der Alkylschutzgruppe erschwert, jedoch konnte sie durch geeignete Wahl der Kupplungsbedingungen erreicht werden. Um die Ankupplung an den sterisch gehinderten Fmoc-(FmocHmb)Gly-OH Baustein zu umgehen, könnte alternativ die Asparaginsäure in Position 15 gegen Asparagin oder Glutaminsäure substituiert werden, da diese Aminosäuren eine verminderte Tendenz zur Ringbildung zeigen [96, 34].

4.1.3 Reversible Modifizierung des Peptidrückgrates

Die Ursache unvollständiger Reaktionen während der Synthese sogenannter "difficult sequences" liegt in der Tendenz der Peptidstränge zu intra- und intermolekularer Assoziation. Wahrscheinlich sind die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen des Peptidrückgrats [71, 103] und Wechselwirkungen hydrophober Seitenketten-Schutzgruppen [5] maßgeblich an der Strukturbildung beteiligt. Daraus resultiert häufig eine geringere Solvataion der Peptidkette sowie eine verminderte Acylierung der α -Aminogruppe oder eine unvollständige Abspaltung der N^α-Schutzgruppe.

Um solche Peptide erfolgreich herstellen zu können, müssen daher Strukturbildung vermeidende Bedingungen geschaffen werden. Wie bereits in Kapitel 1.3 vorgestellt, sind in der Literatur einige Möglichkeiten zur Syntheseoptimierung für schwierige Sequenzen beschrieben worden, die sowohl die Änderung der Reaktionsbedingungen als auch eine geeignete, reversible Modifizierung der Peptidkette beinhalten.

In dieser Arbeit sollten Wege erarbeitet werden, um die zu Beginn dargestellte schwierige Synthese der FBP28 WW-Domäne und ihrer Varianten signifikant zu verbessern. Dabei sollte die Strategie möglichst so gewählt werden, daß große Sequenzabschnitte mit Hilfe eines Syntheseautomaten hergestellt werden können. Aus diesem Grund wurde hier der Schwer-

punkt auf strukturstörende Aminosäurebausteine gelegt, die eine reversible Modifizierung des Peptidrückgrates darstellen. Dazu zählen N-alkylierte Bausteine wie die Fmoc-(FmocHmb)-Aminosäuren oder von Ser/ Thr abgeleitete Oxazolodin-Dipeptideinheiten. Auch das Einfügen von Depsi-Bindungen kann die Synthetisierbarkeit schwieriger Sequenzen erhöhen. Der Nutzen der jeweiligen Strategie für die Herstellung von FBP28 WW-Varianten wurde im Folgenden einzeln untersucht.

Reversible N-Alkylierung

Um eine Verbesserung der Synthese von schwierigen Sequenzen auf dem Weg der N-alkylierten Aminosäurebausteine zu erreichen, wurden eine Reihe von Derivaten entwickelt, deren Einsatz jedoch häufig eine erschwerte Acylierung des sterisch gehinderten sekundären Amins nach sich zog. Durchgesetzt haben sich dagegen die Hmb-Derivate, da hier die N-Acylierung wahrscheinlich über den Umweg der basenkatalysierten O-Acylierung mit anschließender intramolekularer O→N Acylwanderung erheblich vereinfacht wird [115].

Daher wurde für die 5A-WW Sequenz ein Fmoc-(FmocHmb)Ala-OH Baustein in Position 26 eingesetzt, der die aggregationsbedingten unvollständigen Kupplungen von Asn²² und Ala²³ wesentlich verbessern sollte. In Anlehnung an die Ergebnisse für 5Q-WW wurde die Acylierung des (Hmb)Ala-Peptids mit Fmoc-Thr(tBu)-OH über die DIC/ HOBt Methode durchgeführt. Die Verlängerung der Sequenz bis Thr¹⁸ erfolgte über TBTU/ DIEA (Einfachkupplung) mit anschließender Acetylierung der noch freien Aminogruppen, um weitere kritische Stellen zu identifizieren. Von diesem Rohprodukt (Abbildung 4.4 A) wurden die sechs größten Peaks isoliert und über Massenspektrometrie untersucht.

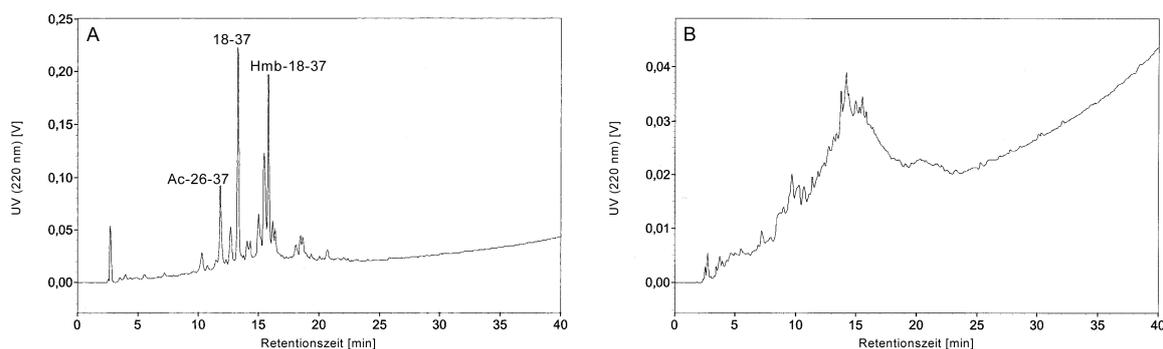


Abbildung 4.4: Synthese von 5A-WW (A) 18-37 über Fmoc-(FmocHmb)Ala-OH in Position 26, die Ankupplung von Thr²⁵ erfolgte über DIC/ HOBt (Doppelkupplung) (B) 1-37 mit Fmoc-(FmocHmb)Gly-OH in Position 16.

Einerseits konnte die Sequenz bis Thr¹⁸ fast ohne Probleme synthetisiert werden, jedoch verlief die Kupplung von Fmoc-Thr(tBu)-OH an (Hmb)Ala²⁶ unvollständig und erschien schwieriger als die Acylierung von (Hmb)Gly¹⁶ durch Fmoc-Asp(OtBu)-OH in 5Q-WW. Darüber hinaus verlief die Abspaltung der Hmb-Schutzgruppe nur zu 50%, was auf eine schlechte Lösungsmittelzugänglichkeit dieser Position unter Abspaltungsbedingungen zurückzuführen sein könnte. Die Kettenverlängerung bis zur vollständigen Sequenz 1-37 mit Fmoc-(FmocHmb)Gly-OH in Position 16, die zur Unterdrückung der Aspartimidbildung und gleichzeitig zur Unterstützung der Synthese in β -Strang 1 dienen sollte, führte zu einer komplexen Mischung aus Fehlsequenzen (Abbildung 4.4 B), die nicht identifiziert werden konnten.

Aufgrund der offensichtlich erschwerten Abspaltung der Hmb-Gruppe wurde der Versuch unternommen, diese durch die Dicyclopropylmethyl-Gruppe (Dcpm) zu ersetzen. Dabei sollte die leichte und schnelle Abspaltung der Schutzgruppe ausgenutzt werden, die besonders für Dcpm-Ester oder Dcpm-Gruppen am Amid-Stickstoff innerhalb der Peptidkette beschrieben wurde [[12] und Carpino L. A. persönliche Korrespondenz]. Dagegen war eine gegenüber der Hmb-Gruppe erschwerte Acylierung des sekundären Amins zu erwarten, da der Dcpm-Rest keine kupplungserleichternde O-Acylierung mit anschließender O \rightarrow N-Acylwanderung ermöglicht.

Für den Ankupplungsversuch an das Dcpm-Ala²⁶-Peptid wurde aus diesem Grund zunächst Bsmoc-Thr(tBu)-OH und HATU eingesetzt. Bsmoc besitzt gegenüber Fmoc den Vorteil, daß der elektronenziehende induktive Effekt der Sulfonfunktion [16] die Elektrophilie des Carboxyl-Kohlenstoffs erhöht und folglich den nucleophilen Angriff der Aminogruppe erleichtert. Darüber hinaus stellt HATU im Vergleich zu HBTU und anderen Kupplungsreagenzien vom Guanidinium- und Phosphoniumtyp das deutlich leistungsfähigere Reagenz dar [13] und wurde daher für diesen Kupplungsschritt gegenüber den anderen bevorzugt.

Über diese Methode konnte jedoch keine Acylierung von (Dcpm)Ala²⁶ erreicht werden. Alle nachfolgenden Bemühungen ¹ zur Ankupplung von Thr²⁵ an das (Dcpm)Ala-Peptid, die verlängerte Kupplungszeiten und Verwendung der Dinitrobenzylsulfonyl-Schutzgruppe (Dnbs) mit stärkerem induktiven Effekt einschlossen, verliefen ebenfalls erfolglos. Besonders mit Carbonsäurechloriden wurden in der Vergangenheit gute Erfolge bei der Ankupplung an stark sterisch gehinderte Systeme erzielt [15, 50]. Allerdings konnten in diesem Fall selbst

¹Die Ankupplungsversuche von Threonin-Derivaten an (Dcpm)Ala²⁶ wurden mit folgenden Methoden unternommen, die im Methodenteil ausführlicher beschrieben sind. Bsmoc-Thr(tBu)-OH/ HATU/ DIEA 2 x 60 min in DMF; Bsmoc-Thr(tBu)-OH/ DIC/ HOAt 2 x 16 h in DCM; Dnbs-Thr(Bzl)-OH/ HATU/ DIEA 1 x 1 h in DMF; Dnbs-Thr(Bzl)-OH/ Symmetrisches Anhydrid /DMAP 1 x 2 h in DCM; Dnbs-Thr(Bzl)-Cl/ DIEA 1 x 3 h in DMF.

hochreaktive Reagenzien wie das Dnbs-Thr(Bzl)-Cl keine Ankupplung erzielen.

In einem weiteren Versuch wurde die Acetylierung des sekundären Amins mit Acetanhydrid am Modelldipeptid (Dcpm)Ala-Ala- β -Naphthylamid in Lösung untersucht. Die Lösungssynthese zeigt gerade für sterisch anspruchsvolle Reste eine verbesserte Zugänglichkeit des Amins für Lösungsmittel und Reaktanden, die durch die Abwesenheit der festen Phase bedingt ist. Wie aus Tabelle 4.3 hervorgeht, erfolgte selbst in Lösung die Acetylierung mit Acetanhydrid extrem langsam.

Tabelle 4.3: Acetylierung von (Dcpm)Ala-Ala- β -Naphthylamid in Lösung

Zeit [h]	Produktausbeute n. HPLC [%]
0,25	9
1,25	24
2,00	34
4,00	59

In der Literatur sind eine Fülle von Möglichkeiten und Strategien veröffentlicht, die assoziationsbedingte Syntheseschwierigkeiten im jeweils betrachteten Fall erfolgreich verringert haben. Häufig beruhten diese Herangehensweisen auf der Modifikation "externer Faktoren", wie z.B. Änderung des Lösungsmittels, Wahl einer höheren Temperatur oder Zusatz von chaotropen Salzen [152]. Allerdings wurde der Einsatz von N $^{\alpha}$ -Hmb-substituierten Aminosäuren im Vergleich zu "externen Faktoren" als leistungsfähiger beschrieben [57]. Gerade im Falle einer schwierigen Sequenz, von der ein ganzes Set abgeleiteter Varianten synthetisiert werden soll, kann sich die Verwendung von strukturstörenden Bausteinen in der Peptidkette vorteilhaft erweisen. Aus diesem Grund erschien die Variante der Integration von N-Alkylaminosäuren oder den im folgenden Abschnitt untersuchten Pseudo-Proline erfolgversprechend, da sie die Strangassoziation, durch Substitution des wasserstoffbrückenbildenden Amidprotons sowie durch sterisch anspruchsvolle Seitenketten, direkt in der Sequenz stören. Die hier präsentierten Ergebnisse der Syntheseoptimierung über N-alkylierte Aminosäure-Derivate haben deutlich gezeigt, daß sich speziell durch Hmb-Aminosäuren nicht nur die Imidbildung unterdrücken ließ sondern auch zumindest bis Position 18 der FBP28 WW-Domäne die Strangassoziation verhindert werden konnte. Hmb-Bausteine wurden schon zu-

vor erfolgreich in der Synthese von β -Amyloid (1-43) [106], Acyl Carrier Protein (65-74) [64] und der 3-repeat-Region des humanen Tau-2-Proteins [105] eingesetzt. Als nachteilig erwies sich, wie auch schon anderweitig beschrieben [57, 115], die Kupplung an N-alkylierte Aminosäuren, die durch sterische Hinderung für Hmb, aber besonders für Dcpm extrem erschwert war. Wie bereits gezeigt wurde, war die Kupplung an das (Dcpm)Ala-Peptid offensichtlich so stark gehindert, daß der Einsatz von Dcpm-Aminosäure-Derivaten zumindest als monomere Bausteine zur Synthese von schwierigen Sequenzen kaum möglich erscheint. Um den potentiell strukturstörenden Einfluß und die leichtere Abspaltbarkeit der Dcpm-Gruppe für die Synthese von FBP28 WW und anderen schwierig synthetisierbaren Peptiden zu nutzen, könnten, in Analogie zu den im folgenden Abschnitt untersuchten Pseudo-Prolinen, Dipeptidbausteine hergestellt und verwendet werden. Jedoch wurde bereits in einem ähnlichen Ansatz für die 2,4,6-Trimethoxybenzyl-Gruppe (Tmob) beschrieben, daß ein solcher Dipeptidbaustein zur Racemisierung an der Tmob-geschützten Aminosäure neigt [115].

Substitution von X-Ser/ Thr-Dipeptideinheiten durch entsprechende Pseudo-Proline

Als weitere Variante zur Verbesserung der Synthese von FBP28 WW wurden Pseudo-Prolin-Dipeptideinheiten als strukturstörende Bausteine untersucht. Dazu wurde in WW-WT Fmoc-Glu(OtBu)-Ser($\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH in Position 27-28 anstelle eines Hmb- oder Dcpm-modifizierten Aminosäure-Derivates in Position 26 von 5A-WW eingesetzt. Die Ankupplung an den Dipeptidbaustein verlief vollständig und problemlos über die TBTU/ DIEA- Methode. Die Fortführung der Synthese wurde entsprechend der Herstellung von 5A-WW mit Hilfe von Hmb durchgeführt. Auch hier sollte die Aspartimidbildung durch den Einbau von Fmoc-(FmocHmb)Gly-OH in Position 16 vermieden werden. Die Analyse der Synthese bis Thr¹⁸ ergab, daß das WW-WT 18-37 Produkt laut RP-HPLC-Auswertung (UV) zu 34% vorhanden war. Dagegen zeigte das WW-WT 1-37 Rohprodukt einen vollständigen Abbruch nach Lys¹²; die analytische RP-HPLC war ähnlich komplex wie für 5A-WW 1-37 aus Abbildung 4.4 B.

Nach diesem ernüchternden Ergebnis wurde auf den Einsatz von Hmb-Derivaten verzichtet und die Synthesestrategie vollständig auf die Verwendung von Pseudo-Prolinen in den Positionen 5-6, 17-18 und 27-28 bzw. 28-29 umgestellt. Zur Minimierung der Succinimidbildung in Loop 1 wurde die Asparaginsäure in Position 15 durch Asparagin bzw. Glutaminsäure substituiert. Auf diesem Wege konnte 5A-WW erfolgreich hergestellt werden, allerdings minderte ein Abbruch nach Ala⁴ zu 4-37 (49% nach RP-HPLC) die Ausbeute an Zielsequenz 1-37 (27% nach RP-HPLC). Offensichtlich konnte der dritte Pseudo-Prolin-Baustein in Position 5-6 die

Ankuppung der Aminosäurereste 1-4 nicht verbessern und wurde daher in nachfolgenden Synthesen nicht mehr eingesetzt. Um dennoch Auslassungssequenzen und Strangabbrüche in der Region 1-4 möglichst für alle FBP28 WW-Varianten zu minimieren, wurden die Reste 1-4 über das reaktivere HATU in dem polareren Lösungsmittel NMP, das die Löslichkeit der voll geschützten Peptidkette verbessern sollte, angekuppelt (Doppelkuppung).

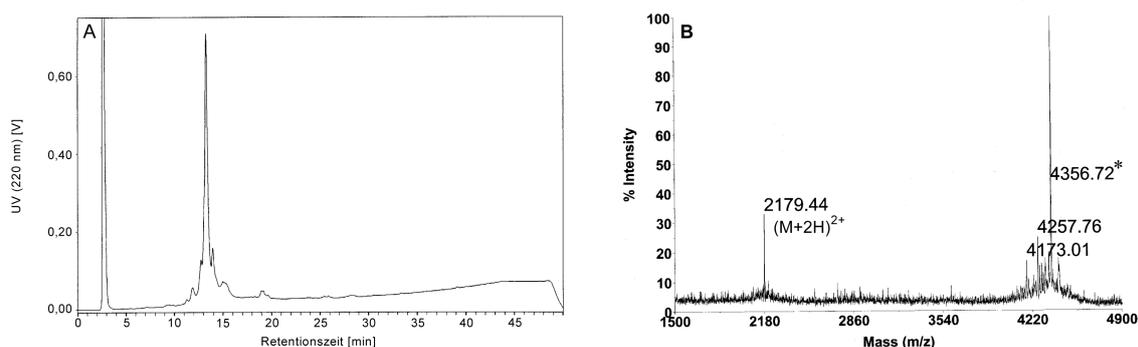


Abbildung 4.5: Synthese von N-WW über zwei Pseudo-Proline; (A) analytische RP-HPLC; (B) MALDI-TOF-MS (* markiert die Masse des Peptids 1-37)

Abbildung 4.5 zeigt die Analytik des Rohproduktes der Synthese von N-WW. Sowohl das Chromatogramm der analytischen RP-HPLC als auch die massenspektrometrische Untersuchung wiesen im Vergleich zu der in Abbildung 4.1 A dargestellten Standardsynthese eine signifikante Verbesserung des Rohproduktes mit deutlich vermindertem Anteil an Fehlsequenzen auf. Die Strategie über zwei Pseudo-Proline, den Austausch von Asp¹⁵ gegen Asn und die verbesserte Acylierung der Reste 1-4 über HATU in NMP war demnach erfolgreich.

Pseudo-Prolin-Dipeptidbausteine ließen sich, wie hier gezeigt werden konnte, im Gegensatz zu den N-alkylierten Aminosäure-Derivaten ohne Schwierigkeiten mit Standard-Kupplungschemie am Syntheseautomaten acylieren. Sie reduzierten die Strangassoziation für alle Varianten sehr effektiv. Dieses Ergebnis ist konsistent mit einem in der Literatur beschriebenen Vergleich der Hmb- und Oxazolidin-Bausteine [115]. Da Pseudo-Proline in C-terminaler Position ein Ser, Thr oder Cys erfordern, sind sie allerdings nicht in jeder beliebigen Position integrierbar. Ihr Einsatz ist gerade bei schwer synthetisierbaren transmembranalen Sequenzen mit hohem Anteil an hydrophoben Resten, wie z.B. Ala, Val, Leu und Ile, limitiert. Gerade hier könnten sich Hmb-Varianten gegenüber Oxazolidinbausteinen überlegen zeigen, sofern, als entsprechende Dipeptidmodule eingesetzt, die erschwerte Acylierung der N-Alkylaminosäure umgangen werden kann.

Da die FBP28 WW-Domäne jedoch eine Reihe von X-Ser- und X-Thr-Kombinationen besitzt, die für die Verwendung von Pseudo-Prolin-Bausteinen geeignet sind, stellte das hier keine Schwierigkeit dar.

Synthesen über Depsipeptidbindungen

Aufgrund des zuvor beschriebenen erfolgreichen Einsatzes von Pseudo-Prolinen wurde die Sequenz



zunächst auf diesem Weg bis zum 13-17 Peptid synthetisiert, wobei eine potentielle Aspartimidbildung mit dem Einbau von Fmoc-(FmocHmb)Gly-OH in Position 16 ausgeschlossen wurde. Um die Syntheseschwierigkeiten in β -Strang 1 respektive der Position Lys¹² zu verbessern, wurde hier der Ansatz über eine Depsi-Bindung zwischen Lys¹² and die Seitenkette von Thr¹³ unternommen.

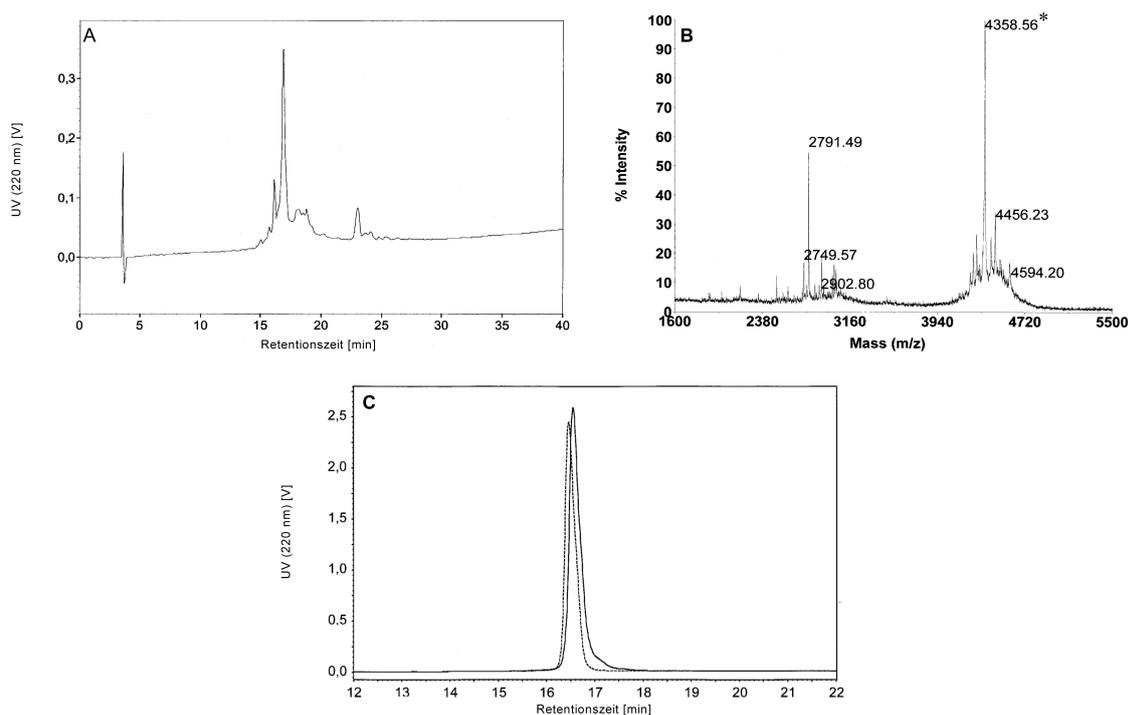


Abbildung 4.6: Synthese von WW-WT über eine Depsi-Bindung zwischen Lys¹² und Thr¹³; (A) analytische RP-HPLC und (B) MALDI-TOF-MS der O-Acyl-Form, (* markiert die Masse des Produkts 1-37) (C) analytische RP-HPLC der O-Acyl- (gestrichelte Linie) und der N-Acyl-Isoform (durchgehende Linie) des gereinigten WW-WT-Peptids.

Dies hatte gegenüber Pseudo-Prolinen den Vorteil, daß die Depsi-Bindung in saurem Milieu nach der Synthese und vollständigen Abspaltung aller Schutzgruppen erhalten bleibt und folglich ihr strukturstörender Einfluß nachhaltig die Assoziationsfähigkeit des Peptides vermindert, wobei gleichzeitig die Löslichkeit verbessert wird [130, 129, 17]. Dieser Effekt kann neben der vereinfachten Synthese besonders die Aufreinigung von Peptiden mit starker Tendenz zur Assoziation erleichtern. Die so hergestellten O-Acyl-Peptide lassen sich nach erfolgter Reinigung unter basischen Bedingungen problemlos in ihre Amidform überführen [129]. Wie die Analyse des Rohproduktes in Abbildung 4.6 A und B zeigt, konnte WW-WT (Depsi) auf diesem Wege ohne Schwierigkeiten und signifikantem Anteil an schwer abtrennbaren Nebenprodukten bis zur vollständigen Sequenz hergestellt werden. Abbildung 4.6 C verdeutlicht die Verschiebung der Retentionszeit sowie die Verbreiterung des HPLC-Peaks, welche mit der Wanderung der O-Acyl-Form in die N-Acyl-Form von WW-WT einhergehen.

Der hier dargestellte Syntheseweg für WW-WT über eine Depsi-Bindung in Position 12-13 resultierte ebenfalls in einem erfolgreichen Aufbau der Sequenz, analog zu der im vorigen Abschnitt beschriebenen Methode über Asn¹⁵ und zwei Pseudo-Prolinen, und kann als Alternative zur Herstellung von FBP28 WW und davon abgeleiteten Analoga eingesetzt werden. Darüber hinaus führte die Ankupplung der Aminosäurereste 1-4 am Syntheseautomaten, unterstützt durch die strukturstörende Wirkung der Depsi-Bindung in Position 12-13, zu einem vollständigen Aufbau dieser N-terminalen Sequenz, im Gegensatz zu dem reinen Pseudo-Prolin-Ansatz. Dennoch wäre die Synthese der FBP28 WW-Varianten mit einem weiteren Pseudo-Prolin Fmoc-Lys(Boc)-Thr ($\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH in den Positionen 12-13 anstelle der Herstellung einer O-Acyl-Isoform sicherlich ähnlich erfolgreich gewesen. Dagegen bedeutet der Syntheseweg über eine Depsi-Bindung einen erhöhten manuellen Aufwand sowie einen zusätzlichen Reinigungsschritt im Anschluß an die O→N-Acylwanderung. In dieser Arbeit wurde daher die Synthese-Methode über Asn¹⁵ und Pseudo-Prolin-Dipeptidbausteinen gegenüber allen anderen hier untersuchten Möglichkeiten favorisiert und für die Herstellung der FBP28 WW-Domäne und -Varianten zur Stabilitätsuntersuchung eingesetzt.

4.2 Untersuchung der β -Faltblatt-stabilisierenden Synergien von Aminosäure-Seitenketten und des Beitrags von Glutamin-Seitenketten

4.2.1 Design der FBP28 WW-Varianten

Die FBP28 WW-Domäne wird maßgeblich durch zwei hydrophobe Molekülgruppen auf beiden Seiten des β -Faltblattes stabilisiert [83, 62] (Abbildung 1.2 auf Seite 12). Gegenüber den Resten auf der unteren, konvexen Seite sind die Seitenketten auf der oberen, konkaven Seite stärker Solvent-exponiert und bilden, wie anhand von NMR-Komplexstrukturen bereits beschrieben wurde, für gewöhnlich die Ligandbindungsstelle der WW-Domänen aus [84, 56]. Nur wenige Aminosäuren der unteren Seite, die nicht am hydrophoben Kern beteiligt sind, bilden untereinander ein zusammenhängendes Netzwerk von Wechselwirkungen. Die Reste Thr⁹, Tyr²¹, Asn²³, Leu²⁶ und Ser²⁸ auf der oberen konkaven Seite formen dahingegen einen Verbund von Interaktionen (Abbildung 4.7), der nicht nur Wechselwirkungen von gegenüberliegenden, sondern auch von diagonal zueinander positionierten Seitenketten enthält.

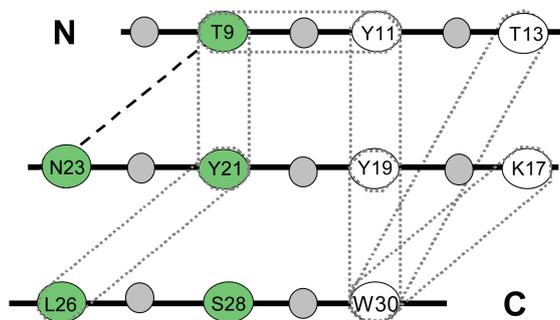


Abbildung 4.7: Schema der Seitenketten-Wechselwirkungen auf der konkaven, potentiell Ligand-bindenden Seite von FBP28 WW, abgeleitet von NMR-Strukturdaten. Die Seitenketten der weiß markierten Reste weisen in Bezug auf die β -Faltblatt-Ebene in die entgegengesetzte Richtung der grauen Gruppen. Die in dieser Arbeit substituierten Reste sind grün dargestellt. Die gestrichelte Linie kennzeichnet eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung, während die gepunkteten Ovale für hydrophobe Interaktionen stehen.

Diese Gruppe von fünf Positionen (Abbildung 4.7 grüne Markierung), deren Aminosäure-Seitenketten alle in der gleichen Ebene liegen, eignete sich daher besonders für das Studium von Struktur-Stabilitäts-Beziehungen eines größeren Bereiches. Im Gegensatz zu dem hier gewählten Ansatz wurden bisher in der Literatur im Wesentlichen Einfach- und Doppelmutationen in β -Faltblatt-Strukturen betrachtet, um die Vorliebe oder Abneigung einzelner Aminosäuren für β -Struktur mit biophysikalischen Methoden zu quantifizieren [128] und besonders stabilisierende Aminosäure-Paare zu identifizieren [127].

Um den Beitrag der einzelnen Reste in dem stabilisierenden Zusammenspiel von mehreren Interaktionspartnern zu untersuchen, sollten Wechselwirkungen durch Entfernen der potentiell miteinander interagierenden Seitenketten eliminiert werden. Eine naheliegende Möglichkeit wäre die Substitution der Aminosäuren durch Glycin, da diese Aminosäure keine Seitenkettenfunktion besitzt. Allerdings bedingt Glycin durch diesen Umstand und die damit einhergehende stark erhöhte Anzahl erlaubter Konformationen im Ramachandran-Diagramm eine wesentliche Erhöhung der Flexibilität der Peptidkette [27], die sich auf Faltung und Stabilität ungünstig auswirken könnte. Demnach würde eine Glycin-Mutation zwei sich überlagernde Effekte induzieren. Dagegen steht auch Alanin aufgrund seiner kurzen aliphatischen Seitenkette den anderen Aminosäuren im Faltblatt nicht mehr als Interaktionspartner zur Verfügung, bringt jedoch weniger Flexibilität in die Peptidkette als Glycin. Aus diesem Grund wurden hier Alanin-Mutationen zur Subtraktion einzelner und mehrerer Wechselwirkungen von Aminosäure-Seitenketten eingeführt, um das stabilisierende Zusammenwirken der Interaktionen von bis zu fünf Seitenketten zu studieren.

Parallel dazu wurde in diese Positionen Glutamin eingesetzt. Glutamine gehören nicht unbedingt zu den bevorzugten oder besonders häufig auftretenden Aminosäuren in β -Faltblatt-Strukturen, wie statistische und biophysikalische Studien zur Tendenz von Aminosäureresten für dieses Sekundärstrukturelement zeigen [23, 128, 65]. Dem steht gegenüber, daß eine durch aggregierte β -Struktur bedingte pathogene Fibrillenbildung von Glutamin-Einzelmutationen hervorgerufen oder verstärkt werden kann, wie am Beispiel der Glu22Gln Mutation in A β (1-42) [81, 151] oder der Leu68Gln Mutation in Cystatin C [1] deutlich wird. Darüber hinaus bilden Mutationen, die eine bereits bestehende Glutaminkette verlängern und dadurch verstärkt zur Ausbildung von intermolekularer β -Struktur neigen, die Grundlage für Chorea Huntington und einigen anderen Humanerkrankungen [100, 21]. Eine große Rolle könnte dabei die Fähigkeit der Glutamin-Seitenketten zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen [141] bis hin zur Ausbildung ausgedehnter Wasserstoffbrücken-Netzwerke spielen, die beispielsweise von den Glutamin-Seitenketten zu den Carbonyl-Funktionen im Peptidrückgrat ausgebildet werden könnten und anhand eines Modells für Huntingtin-Fibrillen vorgeschla-

gen wurden [101]. Die in dieser Arbeit eingebrachten Glutamin-Substitutionen sollten zeigen, ob diese Aminosäuren in der FBP28 WW-Domäne einen Effekt haben, wie sich die Mutationen auf Stabilität und Faltung auswirken und welche Rolle dabei der Glutamin-Seitenkette zukommt.

4.2.2 Untersuchung des Einflusses der Mutationen auf die thermodynamische Stabilität von FBP28 WW

Die thermodynamische Stabilität der synthetisierten FBP28 WW-Varianten (Tabelle 4.4) wurde mittels Circular dichroismus-Spektroskopie (CD) über thermische Gleichgewichtsentfaltung bestimmt und verglichen.

Tabelle 4.4: Sequenzen der FBP28 WW-WT und E¹⁵ bzw. N¹⁵-FBP28 WW-Varianten

Abkürzung	Name	Sequenz
WW-WT	FBP28 WW	GATAV SEWTE YKTAD GKTY YNNRT LESTW EKPQE LK
E-WW	E ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEWTE YKTAE GKTY YNNRT LESTW EKPQE LK-NH ₂
N-WW	N ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEWTE YKTAN GKTY YNNRT LESTW EKPQE LK-NH ₂
5AN-WW	A ^{9,21,23,26,28} N ¹⁵ -FBP28WW-NH ₂	GATAV SEWAE YKTAN GKTY ANART AEATW EKPQE LK-NH ₂
5QN-WW	Q ^{9,21,23,26,28} N ¹⁵ -FBP28WW-NH ₂	GATAV SEWQE YKTAN GKTY QNQR QEQTW EKPQE LK-NH ₂

Das Fern-UV CD-Spektrum für N-WW in nativ gefaltetem Zustand bei 4°C (Abbildung 4.8 B) zeigte ein positives Maximum bei 230 nm. Im Vergleich dazu besitzt das Peptid-Referenzspektrum für β -Faltblatt-Struktur nach Reed et al. [109] (Abbildung 4.8 A) ein negatives Maximum bei 217 nm und ein positives Maximum bei 195 nm. Das CD-Spektrum der WW-Domänen im nativen Zustand ist daher für β -Strukturen untypisch. Das Maximum der WW-Domänen bei 230 nm ist vielmehr durch den Beitrag der aromatischen Seitenketten, in FBP28 WW vornehmlich Trp und Tyr, geprägt als durch die intrinsische β -Struktur des Modells [76, 74]. Dennoch ist das Maximum ein guter Sensor für die Analyse von Faltungs- und Entfaltungsprozessen, wie in Abbildung 4.8 B für die CD-Kurve des denaturierten Zustands bei 90°C dargestellt.

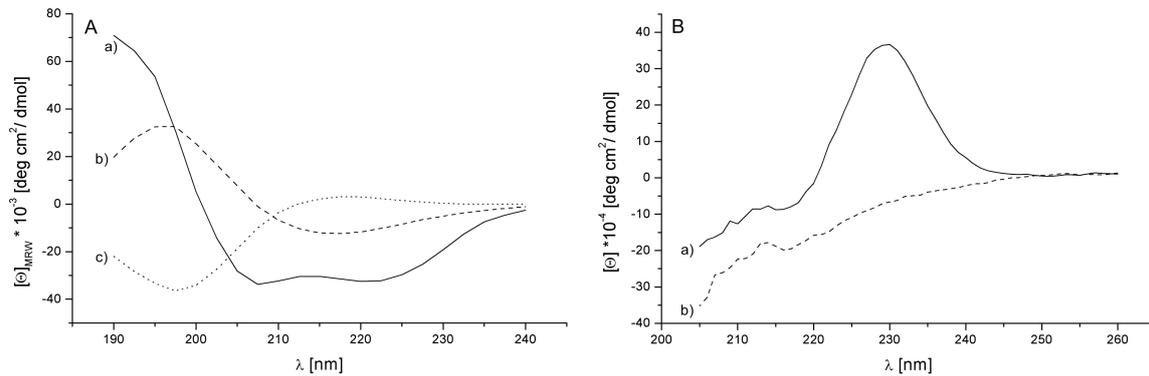


Abbildung 4.8: (A) Peptid-Referenzspektren nach Reed et al. [109] mit a) α -Helix b) β -Faltblatt c) ungeordnete Struktur; (B) CD-Spektren von N-WW a) nativ bei 4°C und b) denaturiert bei 95°C

Die thermische Entfaltung (Abbildung 4.9) zeigte einen für zwei- und dreisträngige β -Faltblatt-Modelle charakteristischen breiten Übergangsbereich, der sich mit einer Gleichung für Zwei-Zustands-Systeme auswerten ließ.

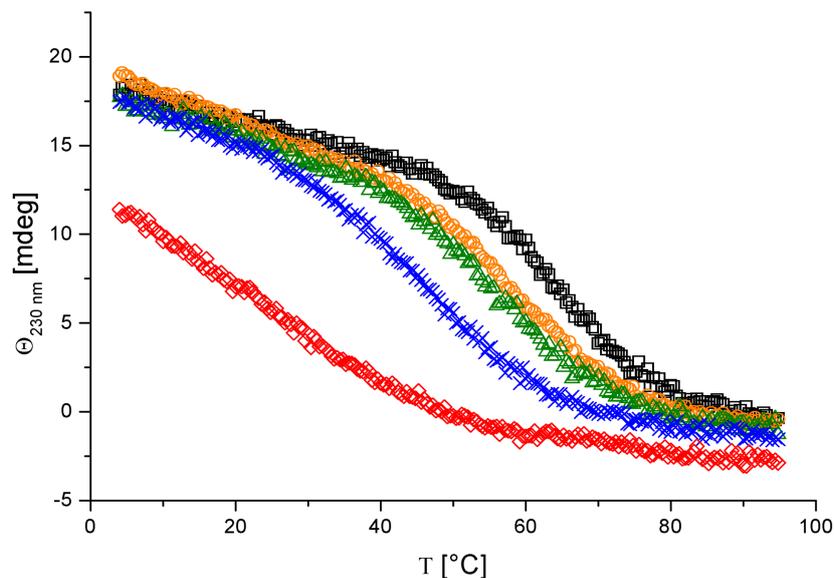


Abbildung 4.9: Thermische Gleichgewichtsentfaltung von WW-WT (□), E-WW (○), N-WW (△), 5QN-WW (x) und 5AN-WW (◇)

Da in der Peptidsynthese von FBP28 WW die Aspartimidbildung der sensiblen Asp¹⁵-Gly¹⁶-Sequenz über einen Austausch von Asp gegen Asn oder Glu vermieden wurde, mußte zunächst der Einfluß dieser Mutationen auf Stabilität und Faltung aufgeklärt werden. Die

Substitution von Asp¹⁵ durch Asn in Loop 1 verringerte die Stabilität der Domäne gegenüber dem Wildtyp signifikant (Abbildung 4.9 und Tabelle 4.5), während sich ein Austausch gegen Glu nicht so stark auswirkte.

Ein Vergleich der FBP28 WW-Struktur mit den NMR-Strukturen von Nedd4 WW und PrP40 A-2 WW (PDB-ID: 1I5H bzw. 1O6W [67, 150]), die ebenfalls die Asp-Gly-Sequenz in Loop 1 aufweisen, zeigte, daß in diesen Domänen die Position 17 analog zu FBP28 WW mit einem positiv geladenen Lysin oder Arginin besetzt ist. Diese Seitenkette ist dort der Asparaginsäure-Seitenkette zugewandt und könnte ein Hinweis auf die Ausprägung einer Loop-stabilisierenden ionischen Wechselwirkung (Salzbrücke) trotz der Solvent-exponierten Position dieser Seitenketten sein. Wie die hier erhobenen thermodynamischen Parameter zeigen (Tabelle 4.5), wirkte sich offensichtlich eine Verlängerung der Seitenkette um eine Methylengruppe zur Glutaminsäure leicht destabilisierend auf die FBP28 WW-Domäne aus und wird möglicherweise durch eine ungünstigere räumliche Anordnung der Seitenkette bezogen auf die Orientierung von Lys¹⁷ verursacht. Wie die weitere Destabilisierung der Domäne durch den Austausch gegen die neutrale Seitenkette von Asparagin vermuten läßt, scheint der Glutaminsäurerest dennoch zur Stabilisierung von Loop 1 fähig, wenn auch in geringerem Maße als die Asparaginsäure-Seitenkette. Im Vergleich dazu bewirkt ein Austausch der Serin-Reste in Loop 1 von Pin1 WW gegen Glycin [62] oder Aminosäurepaare mit der Neigung zu β -Schleifen des Typs I' bzw II' (Asn-Gly bzw. D-Pro-Gly) [69] ebenfalls eine leichte Destabilisierung der Domäne um 4-6°C. Der Einfluß der Seitenketten auf die Stabilität des Loops scheint jedoch gering und selbst Sequenzen, die typischerweise in andere Loop-Architekturen dirigieren, haben kaum einen Effekt. Weiterhin wurde beschrieben, daß diese Mutationen die Struktur der Domäne nicht verändern. Eine stärkere konformationelle Einschränkung von Loop 1 durch den Einbau eines Dibenzofuran-Bausteins in Pin1 WW [69], sowie die stärkere Flexibilisierung des vergleichbaren Bereiches durch Integration eines (2-Amino-ethylsulfanyl)-essigsäure-Bausteins, der in YAP65 WW eine Peptidbindung gegen eine Thioether-Bindung ersetzt [41], wirken sich mit einer Abnahme des T_m um 10°C bzw. 18°C drastischer aus. Auch hier wurde berichtet, daß die Mutationen die Gesamtkonformation der Domänen nicht beeinflussen.

Da die N-WW-Variante Ausgangspunkt für die anschließende Untersuchung des Einflusses von Aminosäure-Substitutionen auf die Stabilität war, wurde die dreidimensionale Struktur mittels NMR untersucht [53]. Abbildung 4.10 A zeigt die Struktur von N-WW im Vergleich zu WW-WT [83].

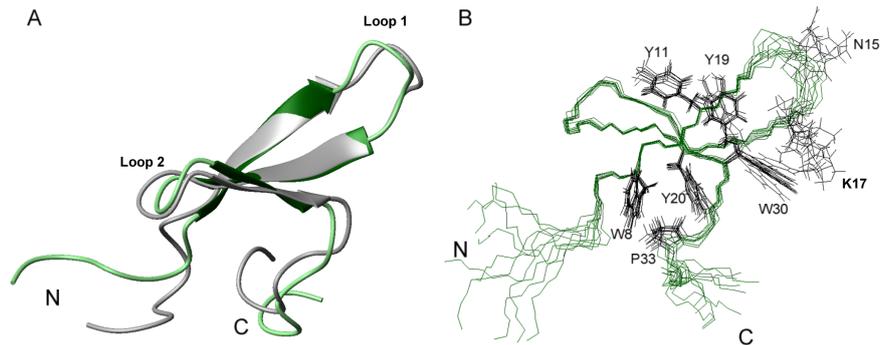


Abbildung 4.10: (A) NMR-Struktur von N-WW [53] (grün) im Vergleich zu WW-WT (grau) nach Macias et al. [83]; (B) Übereinanderlagerung der 10 besten Strukturen von N-WW mit minimaler Gesamtenergie

Die automatische Strukturrechnung mit der Software CYANA ergab, daß N-WW in eine dreisträngige, antiparallele β -Faltblatt-Struktur faltet und hohe Übereinstimmung mit WW-WT aufweist. Eine Übereinanderlagerung der 10 besten Strukturen mit minimaler Gesamtenergie (Abbildung 4.10 B) zeigte gerade für den Loop 1-Bereich sowie für die Seitenketten Asn¹⁵ und Lys¹⁷ eine höhere Flexibilität als in WW-WT. Die mittlere quadratische Abweichung (RMSD) der 10 besten Strukturen der Atome im WW-WT-Rückgrat (7-33) beträgt $0,22 \pm 0,03 \text{ \AA}$ [83] während ein analog berechneter RMSD-Wert für die hier gezeigten N-WW-Strukturen

$0,92 \pm 0,22 \text{ \AA}$ betrug. Die größere Abweichung der 10 Strukturen, welche durch die geringere Definition des Loops verursacht wird, unterstreicht das mögliche Fehlen von stabilisierenden Wechselwirkungen, bedingt durch die Asp15Asn-Mutation. Im Einklang mit den zuvor beschriebenen Mutationsstudien in der Loop 1-Sequenz von Pin1 WW und YAP65 WW zeigte sich der Austausch Asp15Asn in FBP28 WW ebenfalls für eine leicht verminderte Stabilität des Miniproteins verantwortlich, wobei die Integrität der gesamten Konformation nicht wesentlich beeinflusst wurde.

Um die Relevanz der Seitenketten-Wechselwirkungen in den Positionen 9, 21, 23, 26, 28 (Abbildung 4.7) zu untersuchen, wurden diese Aminosäuren durch Alanin substituiert, wie bereits im Abschnitt 4.2.1 näher erläutert. Der Austausch der Seitenketten resultierte in einem nahezu unstrukturierten Peptid mit geringer Stabilität (Abbildung 4.9 und Tabelle 4.5). Offensichtlich sind eine oder mehrere Interaktionen der Aminosäure-Seitenketten in diesem Bereich essentiell für die Stabilität von FBP28 WW.

Die potentielle Wasserstoffbrückenbindung zwischen Thr⁹ und Asn¹⁵ könnte einen Beitrag

leisten. Da diese beiden Reste jedoch stark Solvent-exponiert sind, wird der Beitrag dieser Interaktion möglicherweise klein ausfallen. Vergleichbare Positionen in Pin1 WW und YAP65 WW sind ebenfalls mit Aminosäuren besetzt (Glu und His), die zu einer Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen oder Salzbrücken neigen. Ein Austausch der Glutaminsäure gegen Glutamin in Pin1 WW [62], der die Relevanz der Wasserstoffbrückenbindung zu Histidin und einer Salzbrücke zu dem in β -Strang 1 benachbarten Arginin zeigen sollte, resultiert in einem lediglich geringen Abfall der Stabilität um $\Delta T_m = -4,5^\circ\text{C}$. Demnach könnte auch die Wechselwirkung zwischen Thr⁹ und Asn²³ in FBP28 WW eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Dagegen wurde anhand der Tyr²¹Ala-Mutation [83] verdeutlicht, daß Tyr²¹ bedeutend für die Stabilität von FBP28 WW ist, da diese Mutation die Stabilität der Domäne um $\Delta T_m = -15^\circ\text{C}$ verringert. Darüber hinaus dirigiert Leu²⁶ durch einen hydrophoben Kontakt zu der Seitenkette von Tyr²¹ den Loop 2-Bereich in seine nativ gefaltete Konformation [68]. Möglicherweise nimmt daher die Tyr²¹/Leu²⁶-Wechselwirkung in dem hier untersuchten Bereich eine Schlüsselrolle im Netzwerk der stabilisierenden Interaktionen ein.

Die Hydroxyfunktion der Seitenkette von Serin oder Threonin in Position 28 der WW-Domänen bildet bekanntlich eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonyl-Sauerstoff eines Prolin-Restes aus, der im gebundenen Ligand lokalisiert ist [102]. Ser/Thr in Position 28 ist daher neben den Resten Tyr¹⁹ und Trp³⁰ wichtig für die Fixierung des Liganden an der Domäne. Unklar ist bisher jedoch, ob der Rest in Position 28 ebenfalls einen strukturstabilisierenden Einfluß ausübt.

Neben der Subtraktion der Seitenketten-Interaktionen wird eine derart massive Alanin-Mehrfachmutation ferner zu einer Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche führen, die sich ungünstig auf Löslichkeit und Stabilität auswirken könnte, da in einem kleinen Modellpeptid von der Größe der FBP28 WW-Domäne viele Positionen sehr gut Lösungsmittel-zugänglich sind. Überraschenderweise führte eine Glutamin-Fünffachmutation in den gleichen Positionen zu einer gefalteten und im Vergleich zu 5AN-WW wesentlich stabileren Variante. Offensichtlich können die fünf Glutamine die Wechselwirkungen der originalen Seitenketten zumindest teilweise ersetzen.

Um die mit CD über thermische Entfaltung gewonnenen Ergebnisse abzusichern, wurden für N-WW und 5QN-WW Denaturierungsexperimente mit Harnstoff durchgeführt (Abbildung 4.11 A u. B).

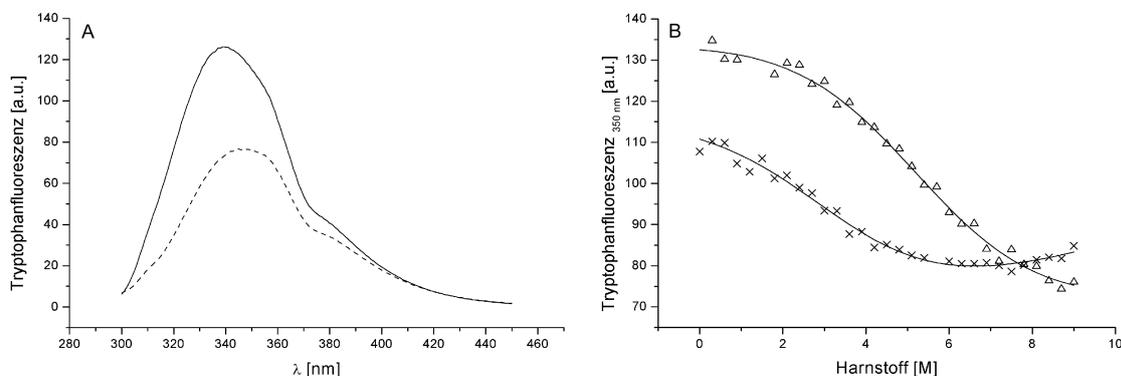


Abbildung 4.11: (A) Fluoreszenzspektren von N-WW a) nativ in 0 M Harnstoff und b) denaturiert in 9 M Harnstoff; (B) Harnstoffinduzierte Gleichgewichtsentfaltung von N-WW (Δ), 5QN-WW (x) sowie die zugehörigen Kurvenanpassungen (Linie) unter Annahme einer Zwei-Zustands-Beziehung

Das Fluoreszenzspektrum für N-WW ohne Harnstoff zeigte eine typische Tryptophanfluoreszenz mit einem Maximum bei 339 nm. In 9 M Harnstoff zeigte die Kurve eine Rotverschiebung nach 345 nm und gleichzeitig eine Abnahme der Fluoreszenzintensität, die auf eine höhere Pufferzugänglichkeit der Tryptophane und folglich auf eine Entfaltung der Domäne hinwies. Da die analogen Spektren für die 5QN-WW Variante stärker zu längeren Wellenlängen verschoben waren, wurden alle Denaturierungskurven einheitlich bei 350 nm ausgewertet, wobei der relative Verlauf der Kurven erhalten blieb.

Die Differenz der freien Enthalpie zwischen dem nativen und dem denaturierten Zustand $\Delta G_{U-N}^{25^\circ C}$ wurde für eine wässrige Pufferlösung ohne Chaotrop bei 25°C bestimmt. Ein Vergleich der freien Enthalpien der Entfaltung aus Temperatur- und Harnstoff-Experimenten ergab, daß die errechneten $\Delta G_{U-N}^{25^\circ C}$ -Werte (Tabelle 4.5) für beide Varianten innerhalb der experimentellen Ungenauigkeit gleich waren. Daher sollte die Annahme eines Zwei-Zustands-Verhaltens, das den Auswertungen zu Grunde gelegt wurde, zutreffend sein.

Tabelle 4.5: Thermodynamische Stabilität der FBP28 WW-Varianten

Peptid	Thermische Entfaltung			Entfaltung über Harnstoff	
	T_m [°C]	ΔH_m [kJ/mol]	$\Delta G_{U-N}^{25^\circ C}$ [kJ/mol]	C_m [M]	$\Delta G_{U-N}^{25^\circ C}$ [kJ/mol]
WW-WT	$64,8 \pm 0,3$	157 ± 13	$14,2 \pm 2$	-	-
E-WW	$60,3 \pm 0,6$	122 ± 12	$10,7 \pm 0,6$	-	-
N-WW	$57,3 \pm 0,6$	117 ± 1	$8,6 \pm 0,2$	5,3	8,6
5QN-WW	$48,1 \pm 1,5$	$96 \pm 0,3$	$5,4 \pm 0,3$	3,3	5,3
5AN-WW	16,4	36	-1,3	-	-

Eine intermolekulare Assoziation hätte möglicherweise zu einem veränderten Kurvenverlauf geführt oder eine geringe Übereinstimmung der $\Delta G_{U-N}^{25^\circ C}$ -Werte aus Entfaltungs-Experimenten mit unterschiedlichen Methoden ergeben. Beide Varianten gaben in den hier dargestellten Gleichgewichts-Messungen keinen Hinweis auf ein solches Assoziationsverhalten, obwohl in FT-IR-Experimenten bei wesentlich höheren Konzentrationen intermolekulare β -Aggregation von N-WW beobachtet wurde (Abbildung 4.22B). Überraschenderweise tendierte die 5QN-WW-Variante nicht zu intermolekularer Assoziation. Gleichgewichtssedimentations-Untersuchungen mittels analytischer Ultrazentrifugation bei Raumtemperatur zeigten, daß beide Peptide in einem Konzentrationsbereich bis 1,8 mM als Monomere vorlagen, jedoch ein geringer Anteil Aggregate bildete, die absedimentierten. Allerdings war im Einklang mit den IR Ergebnissen auch hier der Aggregatanteil für 5QN-WW geringer als für N-WW.

Außerdem mußte aufgeklärt werden, ob 5QN-WW trotz der vielen Mutationen noch eine für WW-Domänen typische Faltung zeigt. Die bisher durchgeführten NMR-Experimente mit anschließender automatischer Strukturrechnung mittels der Software ARIA zeigte deutlich, daß 5QN-WW ebenfalls in eine dreisträngige β -Faltblatt-Struktur mit typischer WW-Konformation faltet [53]. Die Abweichung der hier gezeigten 10 Strukturen mit minimaler Gesamtenergie mit einem berechneten RMSD von $1,41 \pm 0,4 \text{ \AA}$ war jedoch wesentlich größer als für WW-WT und bietet noch Raum für Verfeinerungen.

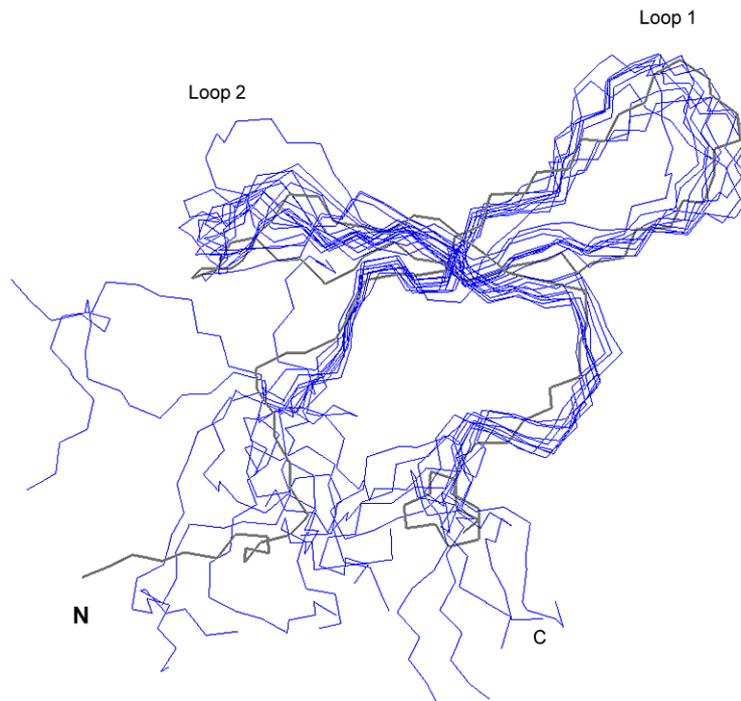


Abbildung 4.12: Überlagerung von 10 Strukturen mit minimaler Gesamtenergie von 5QN-WW (blau) [53] im Vergleich zu WW-WT (grau) [83]

Die Analyse der beobachteten NOE-Kreuzsignale der eingefügten Glutamin-Seitenketten aus den aufgenommenen NOESY-Spektren in 5QN-WW ergab, daß Gln²⁸ und Gln³⁴ sehr flexibel sind und wahrscheinlich keine Wechselwirkungen über ihre Seitenkette eingehen. Dagegen konnten für Gln⁹, Gln²¹, Gln²³ und Gln²⁶ intraresiduale und auch interresiduale NOE-Kreuzsignale beobachtet werden, die auf mögliche stabilisierende Kontakte der Seitenketten hinweisen. Jedoch ließ die hier dargestellte vorläufige NMR-Struktur keine Interpretation hinsichtlich der Richtung der Wechselwirkung zu. Es kann an dieser Stelle daher nicht eindeutig geklärt werden, ob die NH₂-Gruppen der Glutamin-Seitenketten Wechselwirkungen zu den Seitenketten benachbarter Aminosäuren oder Interaktionen zu den Carbonyl-Sauerstoffen des Peptidrückgrats ausbilden. Letzteres wurde bereits zuvor an einem Modell für Huntingtin-Fibrillen von Perutz et al. [101] vorgeschlagen.

4.2.3 Untersuchung der Bedeutung spezifischer Wechselwirkungen für die Stabilität von FBP28 WW

Die erstaunliche Stabilität der 5QN-WW-Variante im Gegensatz zu 5AN-WW deutete darauf hin, daß zumindest ein Teil der in FBP28 WW integrierten Glutamine eine stabilisierende Wechselwirkung eingeht. Die im Folgenden unternommenen Mehrfachmutationen (Tabelle 4.6) waren so gewählt, daß die Bedeutung einzelner Wechselwirkungen durch Alanin-Substitutionen sowie die stabilisierenden Einflüsse durch analoge Glutamin-Substitutionen gezielt untersucht werden konnte.

Tabelle 4.6: Sequenzen zur spezifischen Untersuchung von Wechselwirkungen

Abkürzung	Name	Sequenz
2AN-WW	A ^{9,23} N ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEWAE YKTAN GKTY YNART LESTW EKPQE LK-NH ₂
A ^{21,26} N-WW	A ^{21,26} N ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEWTE YKTAN GKTY Y ANNRT AESTW EKPQE LK-NH ₂
3AN-WW	A ^{9,23,28} N ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEWAE YKTAN GKTY YNART LEATW EKPQE LK-NH ₂
2QN-WW	Q ^{9,23} N ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEWQE YKTAN GKTY YNQRT LESTW EKPQE LK-NH ₂
Q ^{21,26} N-WW	Q ^{21,26} N ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEWTE YKTAN GKTY Y QNNRT QESTW EKPQE LK-NH ₂
3QN-WW	Q ^{9,23,28} N ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEWQE YKTAN GKTY YNQRT LEQ TW EKPQE LK-NH ₂
8QN-WW	Q ^{9,11,19,21,23,26,28,30} N ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEWQE QKTAN GKTQ Y QNQRT QEQTQ EKPQE LK-NH ₂
3A2QN-WW	A ^{9,23,28} Q ^{21,26} N ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEWAE YKTAN GKTY Y QNART QEATW EKPQE LK-NH ₂

Die thermodynamische Stabilität dieser Varianten wurde analog zu den Fünffachmutanten über thermische Entfaltung bestimmt und ist in Schema 4.13 zusammen mit den Substitutionspositionen dargestellt.

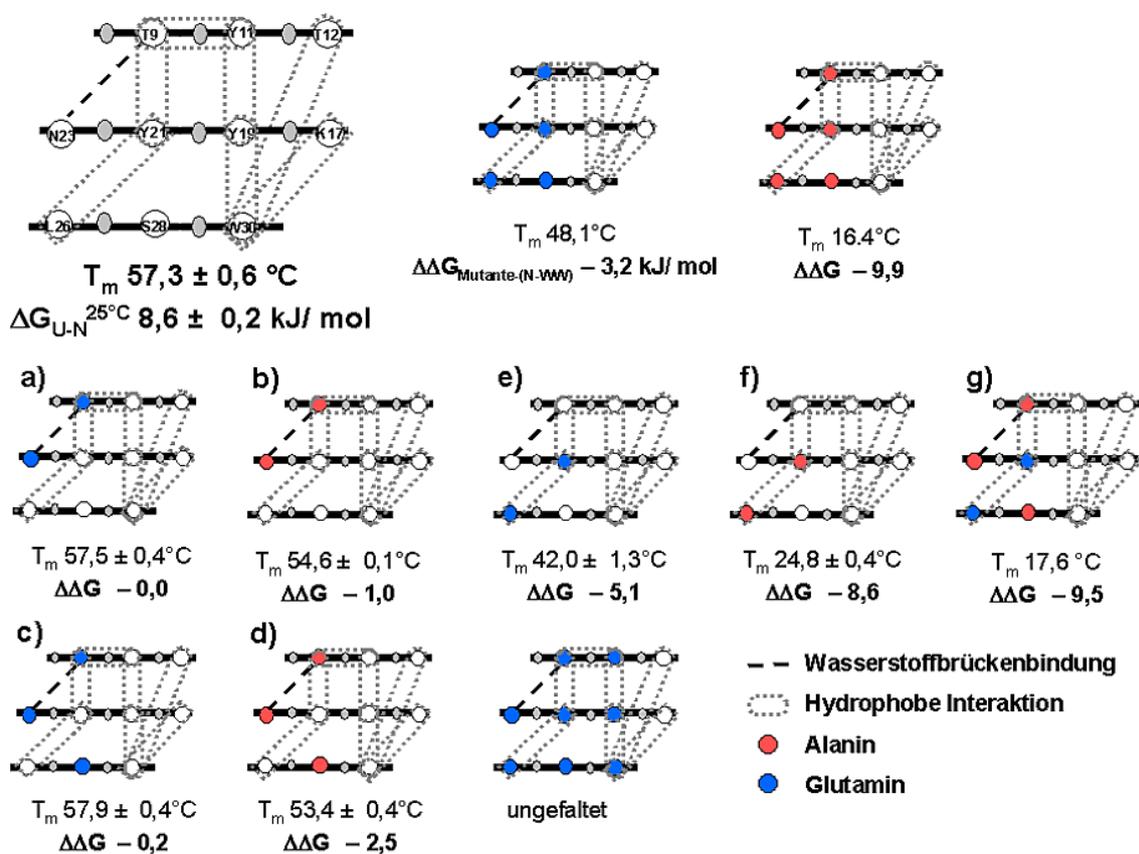


Abbildung 4.13: Schema der Alanin- und Glutamin-Substitutionen und deren Einfluß auf die Stabilität von FBP28 WW. Die in den Piktogrammen abgebildeten Wechselwirkungen nehmen Bezug auf die anhand der NMR-Struktur vorgeschlagenen Interaktionen der Aminosäure-Seitenketten in WW-WT.

Die Doppelmутanten in Abbildung 4.13 a) und b), die den Einfluß einer möglichen Wasserstoffbrücke bzw. ihren Ersatz durch Glutaminreste untersuchen sollten, zeigten keinen Einfluß auf die thermodynamische Stabilität des β -Faltblatts.

Ebenso hatte eine zusätzliche Substitution von Ser²⁸ zu den entsprechenden Alanin- und Glutamin-Dreifachmutanten (Abbildung 4.13 c) und d)) keinen stabilisierenden Anteil. Die Abnahme von $\Delta G_{U-N}^{25^\circ C}$ um 2,5 kJ/ mol für 3AN-WW im Vergleich zu N-WW und 3QN-WW wurde möglicherweise eher bedingt durch die Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche infolge der Substitution von Ser²⁸ durch Alanin als durch eine Wegnahme einer struktur-stabilisierenden Wechselwirkung. In entsprechender Position befindet sich in YAP65 WW ein Threonin. Eine NMR-Komplexstruktur dieser Domäne mit ihrem Ligand zeigt, daß die Seitenkette von Threonin über eine Wasserstoffbrückenbindung zum Ligand den Ligand-Domänen-Komplex stabilisiert [102]. Ser²⁸ könnte demnach im Einklang mit den Erkennt-

nissen aus YAP65 WW bedeutend für eine Ligandbindung sein, während der Einfluß der Seitenkette auf die Stabilität von FBP28 WW eher gering ausfällt.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß in dem hier untersuchten Bereich maßgeblich die hydrophobe Wechselwirkung Tyr²¹/Leu²⁶ für die Stabilisierung der Domäne verantwortlich ist. Um diese Interaktion gezielt zu studieren, wurde die Variante A^{21,26} N-WW synthetisiert. Wie in Abbildung 4.13 f) dargestellt, erwies sich diese Mutante als sehr instabil und unterstrich damit, neben der bereits bekannten und an anderer Stelle erwähnten zentralen Rolle von Tyr²¹, die Bedeutung des hydrophoben Paares Tyr²¹/Leu²⁶ für die Stabilisierung von FBP28 WW. Der Interaktion von Leu²⁶ zu Tyr²¹ wird eine tragende Rolle bei der Ausbildung der nativen Loop 2-Konformation unter Faltungsbedingungen zugeschrieben [68]. Hier zeigt sich darüber hinaus die Bedeutung dieser Wechselwirkung nicht nur für die Faltung, sondern ebenfalls für die Stabilität der Domäne. Dagegen hat eine C- und N-terminal um 4 bzw. 5 Aminosäurereste verkürzte Variante von FBP28 WW mit einer Leu26Ala-Mutation keinen Effekt auf die Stabilität im Vergleich zum entsprechenden Referenzpeptid, allerdings führt dieser Austausch zu einer Stabilisierung von Konformationen mit fehlgefalteter Loop 2-Region [95]. Die Substitution dieser beiden Reste zu Glutamin (Q^{21,26} N-WW, Abbildung 4.13 e)) konnte die Domäne partiell stabilisieren, wobei jedoch die Stabilität der 5QN-WW Variante nicht vollständig erreicht wurde.

Um zu untersuchen, welchen Beitrag isolierte Wechselwirkungen der Gln²¹- und Gln²⁶-Reste zur Stabilität von 5QN-WW liefern, wurden alle übrigen Positionen zu Alanin mutiert (3A2QN-WW Abbildung 4.13 g)). Tatsächlich zeigte diese Variante eine ebenso hohe Instabilität wie A^{21,26} N-WW oder 5AN-WW. Die stabilisierenden Wechselwirkungen der Gln²¹- und Gln²⁶-Reste waren demnach nicht stark genug, um eine ungünstige Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche durch die drei Alanin-Reste zu kompensieren.

Offensichtlich scheinen die Reste Thr⁹, Asn²³ und Ser²⁸ in Q^{21,26} N-WW mit ihren polaren Seitenketten eine verbesserte Löslichkeit des Peptids durch günstige Kontakte zur wässrigen Umgebung zu erwirken, die den stabilisierenden Effekt der Gln²¹- und Gln²⁶-Seitenketten unterstützen.

Weiterhin wurde durch zusätzliche Substitution des hydrophoben Kerns der Reste Tyr¹¹, Tyr¹⁹, Trp³⁰ gegen Glutamin (8QN-WW) untersucht, ob sich der Einfluß der Glutamin-Seitenketten erweitern und möglicherweise durch Ausbildung eines Netzwerks von Interaktionen der stabilisierende Effekt hydrophober Aminosäure-Seitenketten kompensieren ließe. Die Strukturintegrität wurde mittels eindimensionaler ¹H-NMR-Spektroskopie untersucht.

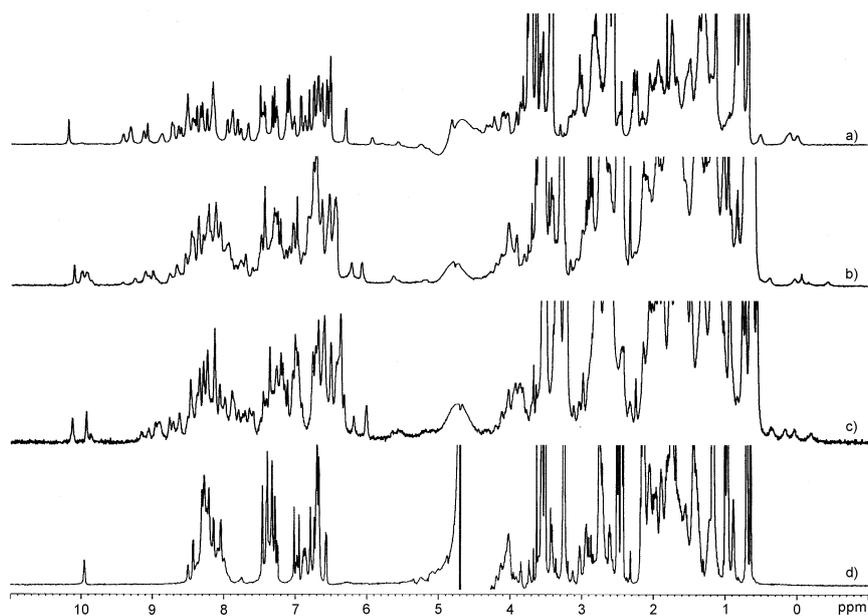


Abbildung 4.14: 1D ^1H -NMR Spektren von a) N-WW, b) 3QN-WW c) 5QN-WW d) 8QN-WW

Wie am Beispiel des 1D- ^1H -NMR-Spektrums der N-WW-Variante deutlich wird (Abbildung 4.14a)), weisen stabil gefaltete WW-Domänen, neben einer sehr guten Dispersion der Signale im NH-Protonen-Bereich (11-6 ppm), charakteristische Signale von Amid-Protonen des Peptidrückgrats bei 9,6-9,0 ppm auf, die umso schärfer sind, je stabiler die Domäne gefaltet ist. Ebenso wiesen die Spektren für 3QN-WW und 5QN-WW (Abbildung 4.14b) und c)) typische Signale auf und waren demnach gefaltet. Darüber hinaus zeigten diese beiden Peptide die ebenfalls für gefaltete WW-Domänen charakteristischen zwei Indol-NH-Signale von Trp⁸ und Trp³⁰ bei ≈ 10 ppm und ein drittes Signal in diesem Bereich, das auf Anteile an ungefaltetem Peptid hinwies.

Im Vergleich zu diesen stabil gefalteten Varianten, offenbarte das Spektrum von 8QN-WW (Abbildung 4.14d)) sehr schlecht dispergierte Signale der NH-Protonen, und die charakteristischen Peaks zwischen 9,6-9,0 ppm fehlten vollständig. Ferner konnte nur ein Indol-NH-Signal bei ≈ 10 ppm beobachtet werden. 8QN-WW zeigte demnach ein typisches Spektrum eines ungefalteten Peptides. Obwohl eine für die Stabilität von FBP28 WW essentielle hydrophobe Wechselwirkung von Tyr²¹/ Leu²⁶ durch Glutamine teilweise ersetzt werden konnte, erzielte der zusätzliche Austausch der stark konservierten Reste Tyr¹⁹ und Trp³⁰ des solvent-exponierten hydrophoben Kerns eine ungefaltete Domäne und führte zu der Schlussfolgerung, daß nur sehr eingeschränkt wichtige hydrophobe Wechselwirkungen durch Glutamine ersetzt werden können.

4.2.4 Design und Stabilität kleiner Glutamin-enthaltender

β -Haarnadel-Modelle

Die Untersuchungen an Glutamin-substituierten FBP28 WW-Domänen legen den Schluß nahe, daß die Stabilität der 5QN-WW-Mutante sowohl durch Wasserstoffbrückenbindungen der Glutamin-Seitenketten, aber auch durch hydrophobe Kontakte aufrechterhalten wird. Die Glutamin-induzierten Effekte sollten sich auch mit Hilfe einfacherer Faltungsmodelle abbilden lassen. Zu diesem Zweck eigneten sich die von Cochran et al. [25] entwickelten Tryptophan-Zipper, die stabile, monomere β -Haarnadel-Strukturen ausbilden. Das Motiv mit der höchsten Stabilität trpzip 3, wurde hier als Ausgangspunkt gewählt, um den Einfluß von Glutaminen zu untersuchen, wobei in Analogie zu den WW-Domänen eine signifikante Verringerung der Stabilität erwartet wurde. Faltblatt-induzierende und stabilisierende Elemente der Loop-Sequenz D-Pro-Asn und der Tryptophane wurden beibehalten, während alle übrigen Seitenketten durch Glutamin ausgetauscht wurden. Die synthetisierten Glutamin-Varianten sind in Tabelle 4.7 aufgeführt.

Tabelle 4.7: Sequenzen Poly-Q Peptide

Name	Sequenz
trpzip3 [25]	SWTWE pNKWT WK-NH ₂
pN-QW Haarnadel	QWQWQ pNQWQ WQ-NH ₂
pE-QW Haarnadel	QWQWQ pEQWQ WQ-NH ₂
Ac-(pE-QW Haarnadel)	Ac-QWQWQ pEQWQ WQ-NH ₂
pN-GW Haarnadel	GWGWG pNGWG WG-NH ₂
sPTurn-3Q	WQQQs PQQQs PQQQ-NH ₂
sPTurn-5Q	Ac-QQQQQ sPQQQ QQsPQ QQQQ-NH ₂
sPTurn-QT	Ac-QTQTQ sPQTQ TQsPQ TQTQ-NH ₂

Das pN-QW Haarnadel-Motiv wies in Analogie zu den publizierten trpzip-Motiven [25] ein Fern-UV CD-Spektrum mit einem stark positiv ausgeprägten Maximum bei 227 nm und einem nahezu ebenso stark ausgeprägten Minimum bei 213 nm (Abbildung 4.15) auf.

Begründet durch die vier enthaltenen Tryptophane in der nur 12 Aminosäuren umfassenden Sequenz, war das CD-Spektrum stärker als bei den WW-Domänen durch die Absorption der aromatischen Seitenketten bei 230 nm geprägt. Weiterhin wurde beschrieben, daß diese intensiven anregungsgekoppelten Banden Interaktionen zwischen den aromatischen Chromophoren widerspiegeln [46].

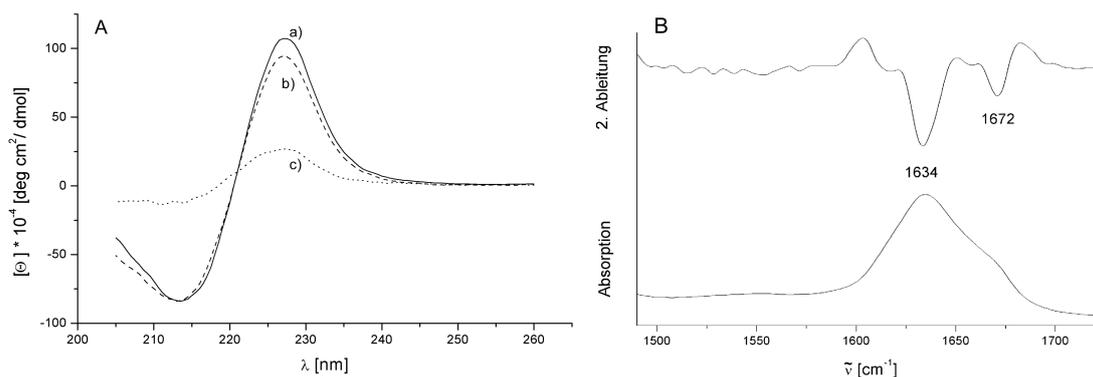


Abbildung 4.15: (A) CD-Spektren von a) pN-QW Haarnadel, b) Ac-(pE-QW Haarnadel), c) pN-GW Haarnadel bei 4°C; (B) FT-IR Spektrum von pN-QW Haarnadel bei Raumtemperatur

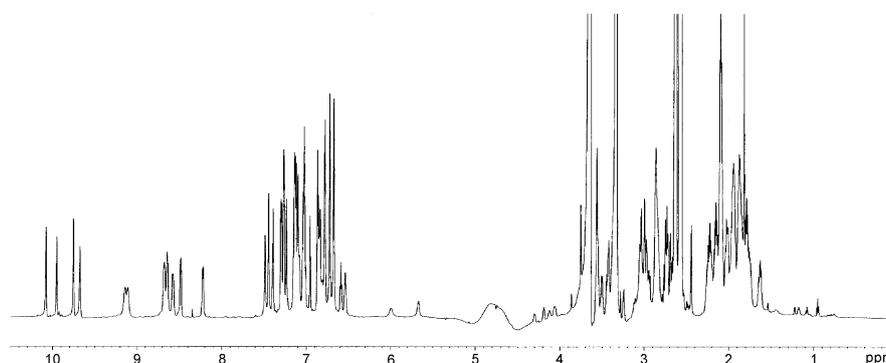


Abbildung 4.16: 1D-¹H-NMR Spektrum von pN-QW Haarnadel bei 15°C

Das FT-IR-Spektrum des pN-QW Haarnadel-Motivs (Abbildung 4.15 B), das nicht durch die Absorption der Tryptophane überlagert wurde, zeigte im Sekundärstruktur-sensitiven Amid I-Bereich eine charakteristische Bande für intramolekulare β -Faltblatt-Struktur bei 1634 cm⁻¹ sowie die zugehörige hochfrequente Bande bei 1672 cm⁻¹. Ferner zeigte das 1D-¹H-NMR-Spektrum von pN-QW Haarnadel, dargestellt in Abbildung 4.16, sehr gut dispergierte Signale im Bereich der NH-Protonen von 11 bis 6 ppm, sowie 4 Peaks bei ≈ 10 ppm,

die analog zu den WW-Domänen, möglicherweise den Indol-NH-Protonen der vier Tryptophane zugeordnet werden können, welche faltungsbedingt unterschiedliche chemische Verschiebungen aufweisen. Demnach unterstützte das NMR-Spektrum die Ergebnisse der CD- und FT-IR-Analysen und es kann angenommen werden, daß das pN-QW Haarnadel-Motiv wahrscheinlich wie das Stammpeptid trpzip 3 in eine β -Haarnadel-Konformation faltet. Da das Modell bestehend aus Glutamin und Tryptophan sehr hydrophob war und befürchtet wurde, daß die ohnehin schlechte Löslichkeit des Peptides durch weitere Mutationen noch stärker herabgesetzt werden könnte, wurde die Loop Sequenz durch die hydrophilere D-Pro-Glu Variante ausgetauscht.

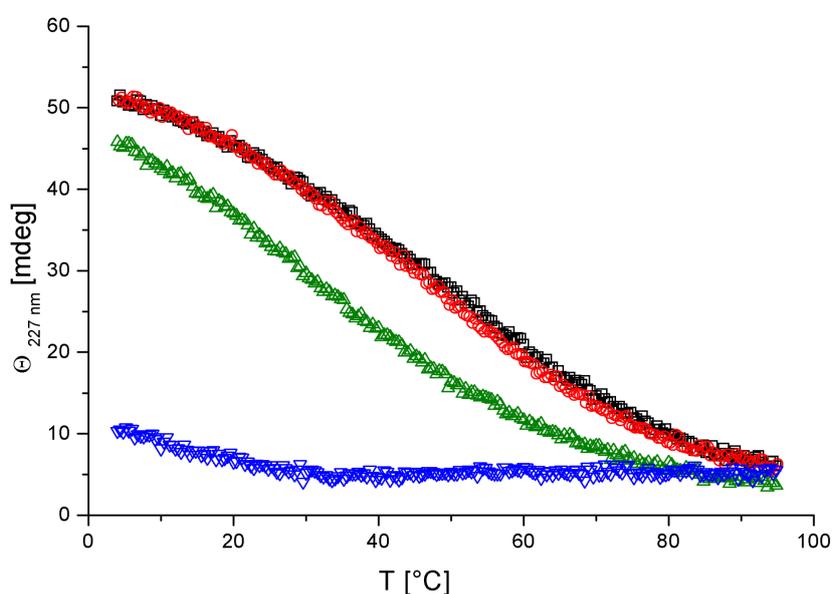


Abbildung 4.17: Thermische Gleichgewichtsentfaltung der Glutamin-Tryptophan Haarnadel-Varianten mit pN-QW Haarnadel (\square), pE-QW Haarnadel (\circ), Ac(pE-QW Haarnadel) (\triangle), pN-GW Haarnadel (∇)

Wie die Abbildung 4.17 zeigt, hatte dieser Austausch in der Loop-Region keinen Einfluß auf die Stabilität des Modells. Eine Acetylierung des N-Terminus führte allerdings zu einer signifikanten Destabilisierung des Peptids. Wahrscheinlich wurde dies durch eine ungünstigere Solvatation der acetylierten Aminogruppe verursacht und war daher entropisch bedingt. Um den stabilisierenden Anteil der Glutamine zu untersuchen, wurden diese gegen Glycin substituiert. Obwohl Glycin die Flexibilität der Peptidkette erhöht und damit die Struktur zusätzlich stören kann, wurde hier, um die Wasserlöslichkeit der Sequenz zu erhalten, dennoch kein Alanin eingesetzt. Das pN-GW Haarnadel-Peptid zeigte eine sehr geringe Faltung und Stabilität im Vergleich zu pN-QW Haarnadel oder pE-QW Haarnadel (Abbildung 4.15 A

und 4.17), was einen β -Faltblatt-stabilisierenden Beitrag der Glutamine unterstreicht und die Ergebnisse der WW-Domänen stützte.

Ferner wurde untersucht, ob sich kurze 3 oder 5 Aminosäurereste lange Glutamin-Peptidketten, die über eine stark Loop induzierende Sequenz (D-Ser-Pro) nach Imperiali et al. [59] verbunden sind (sPTurn Motive Tabelle 4.7), ohne den stabilisierenden Einfluß der hydrophoben Tryptophan-Interaktionen in wässriger Lösung zu einer dreisträngigen Faltblatt-Struktur falten können.

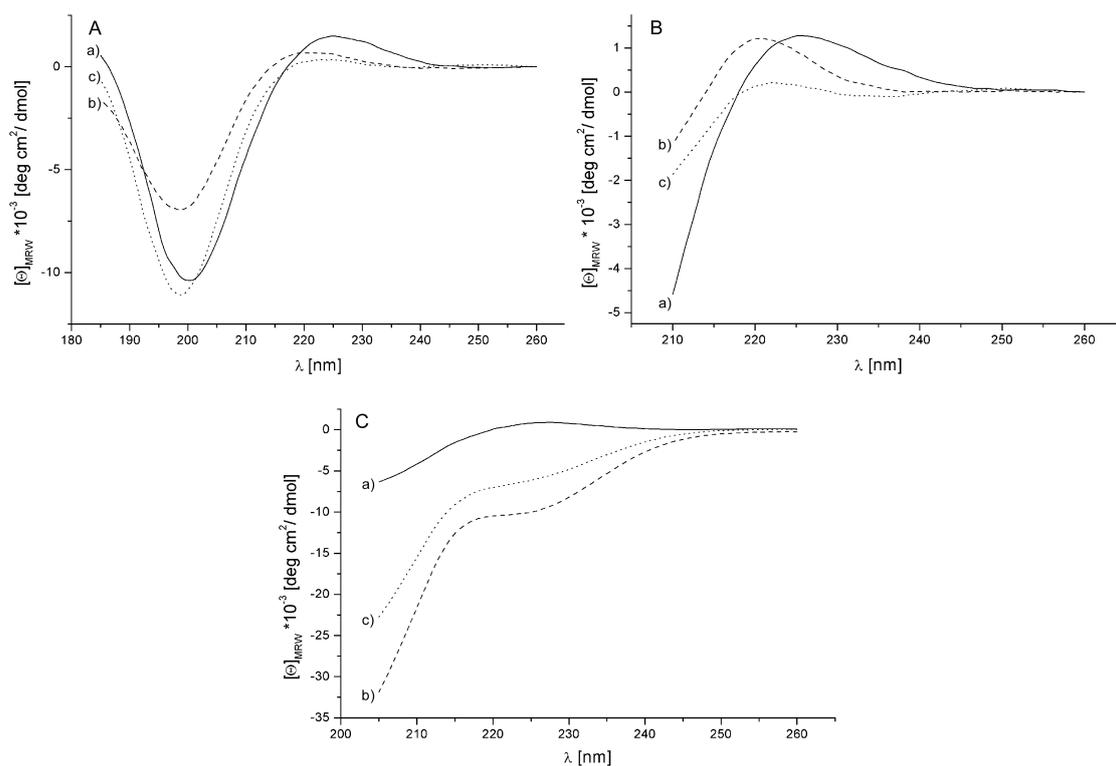


Abbildung 4.18: CD-Spektren der sPTurn-Motive; (A) Spektren in Wasser bei pH 4; (B) Spektren in Phosphatpuffer pH 7; (C) Spektren in 50% Trifluorethanol/Phosphatpuffer pH 7 mit jeweils a) sPTurn-3Q b) sPTurn-5Q und c) sPTurn-QT

Die CD-Spektren der sPTurn-Motive in Wasser und Puffer zeigten Kurvenverläufe analog zu ungefalteten Peptiden (Abbildung 4.18 A und B). Wie in der Literatur für einige andere β -Haarnadel-Modelle beschrieben, kann jedoch ein Zusatz von organischen Lösungsmitteln die Sekundärstrukturierung unterstützen [10, 125]. Daher wurde auch der Einfluß von Trifluorethanol (TFE) untersucht (Abbildung 4.18 C), allerdings zeigte sich für sPTurn-3Q kaum ein Effekt, während für die beiden längeren Varianten eine schwache Zunahme an Struktu-

rierung beobachtet werden konnte. Demnach waren kurze Glutaminketten mit drei Resten nicht in der Lage, strukturstabilisierende, intramolekulare Wechselwirkungen einzugehen, während Peptide mit 5 Resten pro potentiell β -Strang in einem organisch-wässrigen System möglicherweise sehr eingeschränkt dazu befähigt waren. Im Einklang mit dem Ergebnis für 8QN-WW zeigte sich auch in diesem Abschnitt, daß die Wechselwirkungen der Glutamin-Seitenketten für sich allein genommen in den hier untersuchten Modellen keine β -Struktur ausbilden können, sondern durch hydrophobe Interaktionen unterstützt werden müssen.

4.2.5 Einfluß der Mutationen auf die Faltungskinetik der FBP28 WW-Domäne

Um die Auswirkung dieser Substitutionen auf die Faltung der Domäne zu untersuchen, wurden von N-WW und 5QN-WW Temperatursprung-Kinetiken aufgenommen. Eine einzelne Kinetikmessung ist in Abbildung 4.19 A exemplarisch für N-WW in 5,2 M Harnstoff dargestellt.

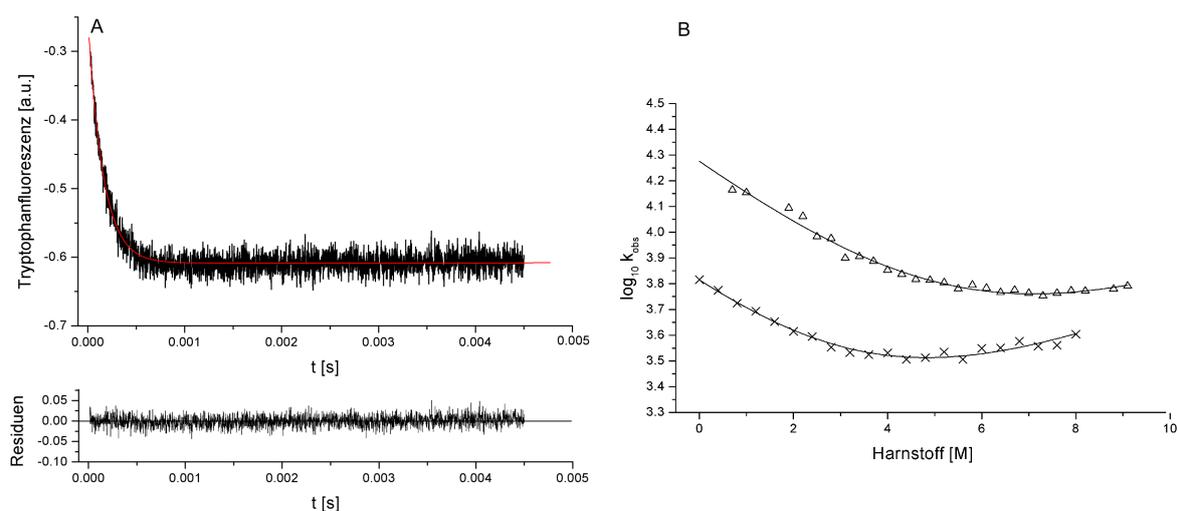


Abbildung 4.19: Temperatursprung-Kinetiken (A) Entfaltungskinetik von N-WW in 5,2 M Harnstoff: Meßdaten (schwarz), Anpassung nach einfach-exponentieller Funktion (rot) (B) Chevron-Diagramm von N-WW (Δ) und 5QN-WW (\times) sowie Kurvenanpassungen an die Meßwerte (Linie)

Diese durch den Temperatursprung induzierte Entfaltungskinetik konnte mit Hilfe einer einfach-exponentiellen Funktion ausgewertet werden und lieferte einen Wert für die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} , die sich jedoch additiv aus Faltungs- und Entfaltungsraten (k_F bzw. k_E) zusammensetzt. Um k_F und k_E bestimmen zu können, mußten für N-WW

und 5QN-WW k_{obs} -Werte bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen ermittelt werden. Die dadurch erhaltenen Raten k_{obs} sind für beide Varianten im Chevron-Diagramm ($\log_{10} k_{obs}$ über der Harnstoffkonzentration) in Abbildung 4.19 B dargestellt.

Im Vergleich zu größeren Faltungsmodellen wie z.B. dem 83 Aminosäuren langen Chymotrypsin Inhibitor 2, dessen Kurvenverlauf von k_{obs} in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration 3 Größenordnungen umspannt [61], zeigten die gemessenen Geschwindigkeiten der beiden FBP28 WW-Varianten einen Verlauf über einen Bruchteil einer Größenordnung. Wahrscheinlich liegt dieses Verhalten in dem breiten Übergangsbereich begründet, der charakteristisch ist für Proteine von der Größe einer WW-Domäne, und eine geringere Kooperativität dieses Modells im Vergleich zu großen globulären Proteinen anzeigt. Dieser wird verursacht durch die niedrigen Reaktionsenthalpien ΔH_m sowie durch die geringe Änderung der Wärmekapazität ΔC_p , die ein Maß für die zunehmende Solvent-Zuwendung hydrophober Reste während der Entfaltung des Proteins ist [2, 95].

Aus der Auftragung im Chevron-Diagramm wurden die reinen Faltungs- und Entfaltungsraten für N-WW und 5QN-WW in wässriger Pufferlösung in Abwesenheit von Harnstoff, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, extrapoliert. Basierend auf dem Mangel an Daten bezüglich der Geschwindigkeitskonstanten k_F und k_E von WW-WT, konnte die Auswirkung der N¹⁵-Mutation in N-WW auf die Faltungskinetik nicht ausführlich untersucht werden. Dennoch konnten die beobachteten Raten k_{obs} miteinander verglichen werden und zeigten, daß die Konstante für N-WW (18872 s^{-1}) gegenüber dem in der Literatur angegebenen Wert für WW-WT ($\approx 32000 \text{ s}^{-1}$) [40] um den Faktor 1,7 geringer war. Jedoch steht die hier beobachtete geringere Geschwindigkeitskonstante zusammen mit der leicht verringerten Stabilität von N-WW verglichen mit WW-WT im Einklang mit den bereits im Bezug auf Stabilität und Konformationsintegrität an anderer Stelle vorgestellten Mutationsstudien in Loop 1 von Pin1 WW und YAP65 WW. In diesen Arbeiten wurde gezeigt, daß sowohl Ser²⁴ in YAP65 WW [41] als auch Ser¹⁸ und Ser¹⁹ in Pin1 WW [62] die Faltung der Domäne kontrollieren und im Übergangszustand der Faltung bereits stark strukturiert sind. Möglicherweise kommt Asp¹⁵ in FBP28 WW eine analoge Aufgabe zu.

Die Untersuchung der Faltungskinetiken von 5QN-WW zeigten im Vergleich zu N-WW (Tabelle 4.8) eine um den Faktor 3 verringerte Faltungsrate, während die Entfaltungsrate nicht erheblich beeinflusst wurde.

Tabelle 4.8: Faltungs- und Entfaltungsraten von N-WW und 5QN-WW

Peptid	$k_F^{H_2O}$ [s ⁻¹]	m_F [kJ/(mol M)]	$k_E^{H_2O}$ [s ⁻¹]	m_E [kJ/(mol M)]	$\Delta G_{U-N}^{25^\circ C}$ [kJ/ mol]
N-WW	17362	0,87	1510	0,37	6,1
5QN-WW	5499	0,93	1029	0,43	4,2

$k_F^{H_2O}$ und $k_E^{H_2O}$ stehen für die Faltungs- und Entfaltungsgeschwindigkeiten in Puffer (ohne Harnstoff); m_F und m_E sind Konstanten, welche die lineare Abhängigkeit von $\log(k)$ zu der Harnstoffkonzentration beschreiben.

Zusammen mit der niedrigeren freien Enthalpie der Faltung betrachtet, könnte der Einbau der Glutamine analog zu dem Zwei-Zustands-Modell eine Stabilisierung des denaturierten Zustandes bedingt haben, die möglicherweise durch ihre bessere Solvatation in wässriger Lösung im Gegensatz zu den hydrophoben Resten verursacht wird. Ferner ist bereits bekannt, daß eine Mutation von Leucin zu Alanin in Position 26 des Loop 2 die Faltung in die native Loop-Struktur von FBP28 WW stört bzw. verlangsamt [95, 68], obwohl die Bildung von Loop 1 in ϕ -Wert Analysen von YAP65 WW und Pin1 WW als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beschrieben ist [41, 62]. Dagegen haben Karanicolas und Brooks berichtet, daß Leu²⁶ in FBP28 WW verglichen mit analogen Positionen in anderen Domänen, die geladene Reste oder Glycin aufweisen, einzigartig ist. Darüber hinaus wird beispielsweise die Konformation von Loop 2 und β -Strang 3 in der Pin1 WW-Domäne durch den hydrophoben Kern fixiert, eine zusätzliche Loop 2-unterstützende hydrophobe Wechselwirkung ist dort nicht notwendig und stellt vielmehr eine Besonderheit der FBP28 WW-Domäne dar [68]. Die Verringerung von k_F durch die Substitution der Tyr²¹/ Leu²⁶ Wechselwirkung mit Glutamin könnte demnach auf eine erschwerte und daher verzögerte Faltung von Loop 2 hinweisen und analog zu der Leu26Ala-Mutante intermediäre Strukturen mit nicht-nativer Loop-Konformation stabilisieren.

Möglicherweise könnten solche metastabilen Spezies Ausgangspunkt für die Bildung von fibrillären Strukturen sein, wie sie für WW-WT und einige andere FBP28 WW-Varianten beschrieben wurden [39]. Daher wurden die Faltungsverläufe und berechneten kinetischen Parameter für N-WW und 5QN-WW auf Hinweise für ein Mehr-Zustands-Verhalten nach den von Jackson und Fersht veröffentlichten Überprüfungsmöglichkeiten [61] untersucht. Für ein Zwei-Zustands-Verhalten müssen die Werte der freien Enthalpie, die aus Gleichgewichts- und Faltungsexperimenten ermittelt werden, miteinander übereinstimmen. Allerdings wi-

chen die entsprechenden $\Delta G_{U-N}^{25^\circ C}$ -Werte von N-WW bzw. 5QN-WW um 2,5 kJ/ mol bzw. 1,1 kJ/ mol voneinander ab, wobei diese Unterschiede wahrscheinlich durch Anpassungsungenauigkeiten an die flachen Kurven im Chevron-Diagramm verursacht wurden und nicht als Indiz für ein zugrundeliegendes Mehr-Zustands-Verhalten der WW-Domänen zu sehen sind. Ferner gab es für 5QN-WW keine weiteren Hinweise auf metastabile Faltungszustände, wie z.B. eine für das Faltungsmodell Barnase [86, 61] beschriebene Nichtlinearität der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} im Bereich niedriger Harnstoffkonzentrationen im Vergleich zur linearen Beziehung im Zwei-Zustands-Modell ("Rollover"). Das läßt den Schluß zu, daß 5QN-WW aufgrund der fehlenden hydrophoben Wechselwirkung Tyr²¹/ Leu²⁶ zwar langsamer faltet, jedoch nicht zu Faltungsintermediaten und einer potentiell darauf aufbauenden vermehrten Fibrillenbildung neigt.

Für N-WW konnten die Faltungsgeschwindigkeiten im Bereich niedriger Harnstoffkonzentrationen nicht experimentell bestimmt werden, da die Raten die zeitliche Auflösung des Meßgerätes unterschritten. Aus diesem Grund konnten für N-WW Faltungsintermediate nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus stehen diese Daten im Einklang mit Ergebnissen aus Messungen mittels analytischer Ultrazentrifugation und FT-IR, die gezeigt haben, daß 5QN-WW gegenüber N-WW eine stark verminderte bzw. keine Tendenz zu Aggregation und Ausbildung von intermolekularer β -Struktur aufweist.

4.3 Bedeutung der aromatischen Aminosäuren

Mit der Synthese und biophysikalischen Charakterisierung der verschiedenen Alanin- und Glutamin-Varianten von FBP28 WW konnte gezeigt werden, daß hydrophob-aliphatische und -aromatische Aminosäuren einen wesentlichen Anteil an der Stabilität von FBP28 WW haben. Frühere Arbeiten haben gezeigt, daß Trp⁸ in β -Strang 1 sowie die hydrophoben Aminosäure-Seitenketten der zentralen Positionen in β -Strang 2, darunter Tyr¹⁹, hoch konserviert sind [83].

Eine Analyse von 83 Domänen der WW-Familie aus der SMART Datenbank (Vers. 4.1) [123, 80] (Abbildung 4.20) ergab, daß Trp⁸ mit einer relativen Häufigkeit von 99% stark konserviert ist. In Position 11 ist das positiv geladene Arginin besonders bevorzugt, während Tyrosin lediglich mit einer relativen Häufigkeit von 7% vertreten ist. Auffällig ist das häufige Auftreten von Alanin mit 16%, was zusammen mit der Diversität der Aminosäure-Seitenketten in Position 11² möglicherweise einen geringen Beitrag der Seitenkette an der Stabilisierung von WW-Domänen vermuten läßt.

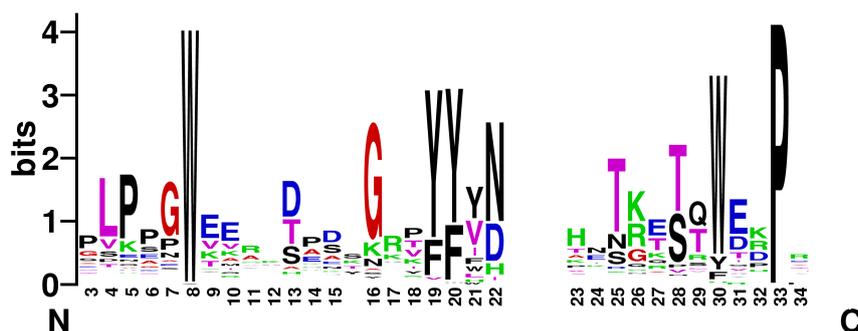


Abbildung 4.20: Grafische Darstellung der positionsabhängigen Häufigkeit spezifischer Aminosäure-Seitenketten in 83 WW-Domänen mit dem WebLog Programm [28]. Die Numerierung der Positionen entspricht der für FBP28 WW verwendeten Nomenklatur nach Macias et al. [83]. Die leeren Felder entstanden durch Domänen mit längeren Loop-Sequenzen.

Die Positionen 19 und 20 sind stark dominiert von Tyrosin (76% bzw. 69%) gefolgt von Phenylalanin (19 bzw. 29%), während aliphatische Seitenketten kaum bzw. gar nicht vertreten sind. In Position 21 halten sich hydrophob-aromatische und -aliphatische Seitenketten mit 49 bzw. 43% die Waage. Bevorzugt sind jedoch die Reste Tyrosin und Valin während

²Relative Häufigkeiten der Aminosäure-Seitenketten in Position 11 [%]: 24 Arg, 16 Ala, 8 His, 7 Tyr, 7 Val, 6 Phe, 6 Ile, 5 Lys, 5 Gln, 4 Leu, 4 Thr, 4 Gly, 1 Glu, 1 Asn, 1 Cys, 1 Trp

Phenylalanin hierunter nur zu 8% vertreten ist.

Diese Analyse steht im Einklang mit den zuvor publizierten Mutationsstudien der konservierten aromatischen Reste, welche ergaben, daß besonders Substitutionen der Reste Tyr¹⁹ und Tyr²¹ durch Alanin die FBP28 WW-Domäne stark destabilisieren. Eine Trp⁸Tyr-Mutation ist, wahrscheinlich bedingt durch die hohe Instabilität des Peptids, über rekombinante Proteinexpression nicht zugänglich, während der Ersatz von Trp³⁰ durch Alanin die Domäne lediglich um $\Delta T_m = -5^\circ\text{C}$ destabilisiert [83]. Selbst der Austausch von Tyr¹⁹ gegen das voluminöse, hydrophobe Leucin resultiert in einer Abnahme der Temperaturstabilität um $\Delta T_m = -9^\circ\text{C}$ [95], war aber unter Berücksichtigung der Datenbankanalyse wenig überraschend. Austausch des Trp³⁰ durch das hydrophobere Phenylalanin führt sogar zu einer leichten Stabilisierung der Domäne um $\Delta T_m = 2^\circ\text{C}$.

4.3.1 Untersuchung der stabilisierenden Wechselwirkung konservierter aromatischer Aminosäuren auf Einzelatom-Ebene

Die Bedeutung der hydrophoben, aromatischen Aminosäure-Seitenketten von Tryptophan und Tyrosin für die Domänen-Stabilität ist durch Mutationsanalysen bereits eindeutig nachgewiesen worden. Unklar bleibt jedoch, welche Interaktionen auf der Einzelatom-Ebene zu einer Stabilisierung führen. Mit Hilfe der in dieser Arbeit geschaffenen Synthesemöglichkeiten konnten geeignete nicht-natürliche Aminosäuren in FBP28 WW eingebaut werden, die eine eingehendere Untersuchung dieser Wechselwirkungen ermöglichten (Tabelle 4.9). Hierzu wurden kommerziell verfügbare Aminosäure-Derivate wie das 1-Methyl-Tryptophan, das 5-Fluor-Tryptophan und das Cyclohexylalanin eingesetzt. Das am Indol-Stickstoff methylierte Tryptophan sollte die Beteiligung dieses Restes an stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen aufklären, wie sie z.B. in der Pin WW-Domäne vom Carbonyl-Sauerstoff der Asn²²-Seitenkette zum Indol-NH von Trp⁸ beschrieben ist [62]. Ferner wird die Hydrophobizität durch die zusätzliche Methylgruppe leicht erhöht und könnte, sofern hydrophobe Effekte dominieren, zu einer stabileren Domäne führen.

Für einige ein- und mehrfach fluorierte Aminosäuren wurde bereits zuvor eine strukturstabilisierende Wirkung beobachtet. Beispielsweise erhöht eine Substitution von 4-Hydroxyprolin durch 4-Fluor-Prolin die thermische Stabilität von Kollagen um $\Delta T_m = 22^\circ\text{C}$ [52]. Ein vergleichbarer Effekt wurde beim Austausch von Pro⁴⁸ gegen 4-Fluor-Prolin in Barstar [110] beobachtet, oder bei der Substitution von Leucin gegen 5,5,5-Trifluorleucin in dem Leucin-Zipper Peptid GCN4-p1d, welche die Stabilität der Coiled-coil-Struktur um $\Delta T_m = 13^\circ\text{C}$ erhöht [144]. Die strukturstabilisierende Wirkung wurde in diesen Beispielen einerseits durch

den starken induktiven Effekt von Fluor auf den Prolin-Rest [52, 110] und andererseits bei Coiled-coil-Strukturen durch den größeren hydrophoben Effekt bzw. eine schlechtere Löslichkeit in Wasser [154] begründet.

Tabelle 4.9: Sequenzen der FBP28 WW-Varianten mit nicht-natürlichen Aminosäurebausteinen sowie mit Phenylalanin und der $^{13}\text{C}_1(4)$ Isotopenmarkierung

Abkürzung	Name	Sequenz
MeW ⁸ N-WW	W(1-Me) ⁸ N ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEBTE YKTAN GKTY YNNRT LESTW EKPQE LK-NH ₂
MeW ³⁰ N-WW	W(1-Me) ³⁰ N ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEWTE YKTAN GKTY YNNRT LESTB EKPQE LK-NH ₂
W(5-F) ³⁰ N-WW	W(5-F) ³⁰ N ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEWTE YKTAN GKTY YNNRT LESTX EKPQE LK-NH ₂
Cha ¹⁹ N-WW	Cha ¹⁹ N ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEWTE YKTAN GKTZY YNNRT LESTW EKPQE LK-NH ₂
5Q2FN-WW	Q ^{9,21,23,26,28} F ^{11,20} N ¹⁵ -FBP28 WW	GATAV SEWQE FKTAN GKTYF QNQRT QEQTW EKPQE LK
*Y ¹¹ 5QN-WW	$^{13}\text{C}_1(4)$ -Y ¹¹ Q ^{9,21,23,26,28} N ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEWQE *YKTAN GKTY YNQRT QEQTW EKPQE LK-NH ₂
*Y ¹⁹ 5QN-WW	$^{13}\text{C}_1(4)$ -Y ¹⁹ Q ^{9,21,23,26,28} N ¹⁵ -FBP28 WW-NH ₂	GATAV SEWQE YKTAN GKT*YY QNQRT QEQTW EKPQE LK-NH ₂

B = 1-Methyl-Tryptophan, X = 5-Fluor-Tryptophan, Z = Cyclohexylalanin, *Y = $^{13}\text{C}_1(4)$ -Tyrosin

Auch der Einsatz von fluorierten Tryptophan-Analoga beeinflusst die thermodynamische Stabilität und Aktivität von humanem Annexin V [92], während die gleichen Tryptophan-Varianten in der Staphylococcus Nuclease kaum eine Veränderung bewirken [153]. Der Effekt von 5-Fluor-Tryptophan wurde in dieser Arbeit zunächst in Position 30 der FBP28 WW-Domäne untersucht.

Die Notwendigkeit der hoch konservierten aromatischen Seitenkette von Tyr¹⁹ wurde durch Substitution mit Cyclohexylalanin (Cha) erprobt. Diese nicht natürliche Seitenkette nimmt ein ähnliches Volumen wie Tyrosin ein, besitzt aber kein aromatisches π -Elektronensystem. Sie klärt daher, ob Tyr¹⁹ eine essentielle π - π -Wechselwirkung zu den benachbarten Aromaten Tyr¹¹ und Trp³⁰ eingeht, oder ob lediglich die Hydrophobizität für die thermodynamische

Stabilität der WW-Domäne von Bedeutung ist. Ferner testet Cha, ob eine potentielle Wasserstoffbrückenbindung ausgehend von der Tyrosin-Seitenkette wichtig ist.

Die thermodynamische Stabilität dieser N-WW Varianten (Tabelle 4.9) wurde mittels CD-Spektroskopie über thermische Entfaltung erprobt. Die CD-Spektren bei 4°C (nativ) und 95°C (denaturiert) zeigten einen analogen Verlauf zu Kurven von N-WW (Abbildungen 4.8 B und 4.9). Es war daher anzunehmen, daß alle diese Varianten ebenfalls bei 4°C eine typische WW-Konformation einnehmen, während sie bei 95°C ungefaltet sind. Die Auswertung der Entfaltungskurven aus Abbildung 4.21 ist in Tabelle 4.10 dargestellt.

Tabelle 4.10: Thermodynamische Stabilität der FBP28 WW-Varianten mit nicht-natürlichen Aminosäurebausteinen

Peptid	T_m [°C]	ΔH_m [kJ/mol]	$\Delta G_{U-N}^{25^\circ C}$ [kJ/mol]
MeW ⁸ N-WW	56,4 ± 0,3	125 ± 4	9,7 ± 0,1
MeW ³⁰ N-WW	59,0 ± 0,4	126 ± 2	9,2 ± 0,3
W(5-F) ³⁰ N-WW	56,9 ± 0,02	143 ± 5	11,1 ± 0,5
Cha ¹⁹ N-WW	60,9 ± 0,4	121 ± 5	9,5 ± 0,4

Der Austausch der Tryptophane gegen das leicht hydrophobere 1-Methyl-Tryptophan zeigte keinen Einfluß in Position 8 und einen gering stabilisierenden Einfluß in Position 30 von FBP28 WW. Es kann daher ausgeschlossen werden, daß die Indol-NH-Gruppe eine für die Stabilität essentielle Wasserstoffbrückenbindung zu anderen Seitenketten oder Carbonyl-Funktionen im Peptidrückgrat eingeht. Der ausbleibende Effekt aufgrund der Substitution von Trp⁸ war insofern unerwartet, da hier weder eine leichte Erhöhung der Hydrophobizität zu einer Zunahme der Stabilität führte, noch die zusätzliche Methylgruppe die Wechselwirkungen des kompakten, Solvent-abgewandten hydrophoben Kerns Trp⁸/ Tyr²⁰/ Pro³³ störte. Dagegen war MeW³⁰ N-WW, möglicherweise bedingt durch die leicht erhöhte Hydrophobizität, stabiler verglichen mit N-WW.

Im Gegensatz zu 1-Methyl-Tryptophan resultierte der Einsatz von 5-Fluor-Tryptophan in Position 30 nicht in einer stabileren Variante. Der T_m -Wert von W(5-F)³⁰ N-WW war vergleichbar mit dem gemessenen Wert für N-WW, jedoch war ΔH_m signifikant erhöht und zeigte eine stärkere Kooperativität der fluorierten WW-Variante. Die Darstellung des Ent-

faltungverlaufs unter Gleichgewichtsbedingungen von N-WW und W(5-F)³⁰ N-WW in Abbildung 4.21 wies ebenfalls auf eine analoge Übergangstemperatur T_m , aber eine leicht erhöhte Kooperativität der Fluor-Mutante hin.

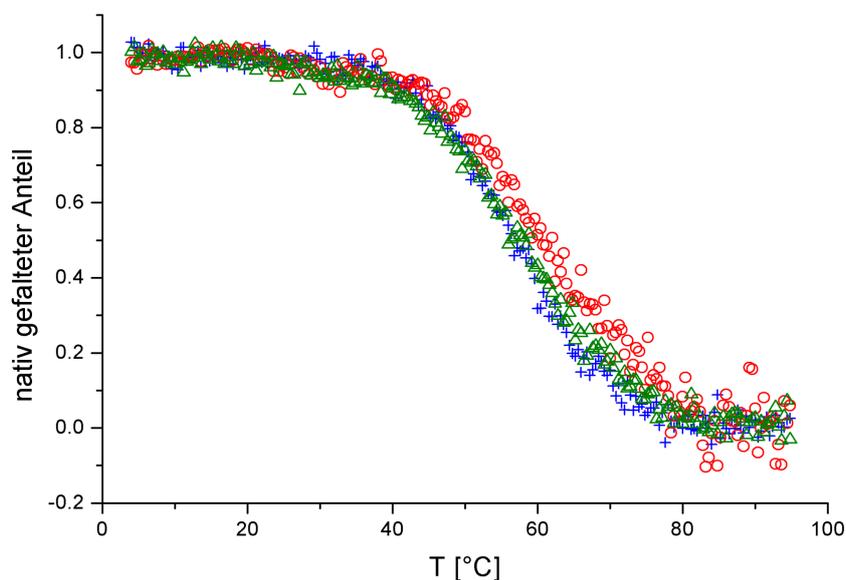


Abbildung 4.21: Thermische Entfaltung über CD-Spektroskopie von N-WW (Δ), W(5-F)³⁰ N-WW (+) und Cha¹⁹ N-WW (\circ)

Im Vergleich dazu zeigte ein von Minks et al. untersuchter Austausch des in Solvent-abgeschirmter Position lokalisierten Trp¹⁸⁷ in humanem Annexin V gegen 5-Fluor-Tryptophan [92] zwar keinen Einfluß der Substitutionen auf die mittels Röntgen-Strukturanalyse untersuchten Konformation des Proteins, resultiert aber in einer leichten Erhöhung der Temperaturstabilität um $\Delta T_m = 1,5^\circ\text{C}$ für das 5-Fluor-Tryptophan-Protein. Ein vergrößertes ΔH_m , das auf eine stärkere Kooperativität des Faltungsübergangs hindeutet, wird ebenfalls beobachtet und auf die leicht erhöhte Hydrophobizität der Fluor-Variante gegenüber natürlichem Tryptophan zurückgeführt, welche von Wong und Eftink über Bestimmung der Verteilungskoeffizienten in einem Oktanol/ Phosphatpuffersystem [153] bestätigt wurde. Jedoch haben die untersuchten destabilisierenden 4-Fluor- und 6-Fluor-Tryptophan-Varianten von Annexin V gezeigt, daß neben der Hydrophobizität auch andere Parameter berücksichtigt werden müssen wie z.B. elektrostatische oder auch sterische Effekte [92]. Die Substitution des Solvent-exponierten Tryptophan-Restes gegen Fluor-Analoga in der Staphylococcus Nuclease hat dagegen kaum Einfluß auf die Temperaturstabilität des Proteins bzw. die Kooperativität seiner Entfaltung [153]. Die für W(5-F)³⁰ N-WW beobachtete stärkere Kooperativität, wel-

che durch die vergrößerte Reaktionsenthalpie ΔH_m angezeigt wird, ist möglicherweise, analog zu den Ergebnissen an Annexin V, ebenfalls durch den Einbau von 5-Fluor-Tryptophan und der damit einhergehenden Erhöhung der Hydrophobizität in dieser Position verursacht worden. Die unveränderte Übergangstemperatur T_m dieser FBP28 WW-Variante könnte ein Hinweis darauf sein, daß in Position 30 des Solvent-exponierten hydrophoben Kerns nicht nur die Lipophilie eines Aminosäurerestes ausschlaggebend ist, sondern möglicherweise durch die höhere Polarität der C-F-Bindung hervorgerufene Ladungs-Abstoßungseffekte des Fluor zu benachbarten Gruppen oder ungünstige sterische Verhältnisse den stabilisierenden Beitrag der Hydrophobizität überlagern.

Die Substitution von Tyr¹⁹ durch Cha führte zu einer signifikanten Stabilisierung. Die Übereinanderlagerung der N-WW- und der Cha¹⁹ N-WW-Variante stützte diese These. Überraschenderweise konnte anhand der Tyr19Cha-Mutation gezeigt werden, daß, im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen wesentlich instabileren Varianten Tyr19Ala und Tyr19Leu sowie den Ergebnissen der oben beschriebenen Datenbankanalyse, in dieser Position keine aromatische Seitenkette erforderlich ist. Der Einfluß dieses aromatischen Restes ist demnach ausschließlich auf sein Volumen und seine hydrophobe Wechselwirkung zurückzuführen. Darüber hinaus wurde für ein Haarnadelmotiv beschrieben, daß Cha eine stärkere Neigung zur Beteiligung an β -Faltblatt-Strukturen besitzt als Phe und besonders als Aminosäurepaar stärker stabilisierend wirkt als die aromatische Phe-Phe Kombination [145].

4.3.2 Studium des Mikromilieus von Tyrosin-Seitenketten in FBP28 WW

Eine weitere Methode, um Informationen über die Struktur und Stabilität von Proteinen zu erhalten, stellt die FT-IR Spektroskopie dar. Hierbei wird häufig die Sekundärstruktur-sensitive, starke Amid I-Bande (C=O-Streckschwingung) zwischen 1610 und 1700 cm^{-1} als Standard zur Bestimmung des Strukturanteils genutzt. Darüber hinaus können von Absorptionsbanden der Aminosäure-Seitenketten wertvolle Aussagen über globale und eventuell auch über lokale Konformationsänderungen erhalten werden. Als besonders nützlich hat sich in der Vergangenheit die intensive Absorptionsbande der Tyrosin-Seitenkette bei 1515 cm^{-1} (C-C Streckschwinung des aromatischen Ringsystems) erwiesen, deren Frequenz sich auf charakteristische Weise während der Entfaltung des Proteins verschiebt [38, 156, 149] und möglicherweise Aussagen über das Mikromilieu eines Tyrosinrests zuläßt. Aus diesem Grund war eine Infrarot-spektroskopische Untersuchung der FBP28 WW-Domäne, die insgesamt

vier Tyrosine an unterschiedlichen Positionen beider hydrophober Cluster besitzt, von Interesse, wobei die Hoffnung bestand, durch Mutation entsprechender Tyrosine möglicherweise auch Informationen über lokale Konformationsänderungen erhalten zu können.

Die Abbildung 4.22 A zeigt das Infrarot-Absorptionsspektrum von N-WW bei 10°C sowie dessen zweite Ableitung, welche eine bessere Zuordnung der Absorptionsbanden einzelner Bereiche ermöglicht und darüber hinaus schwache Banden hervorhebt. Die Absorptionsbanden wurden durch die Bildung der zweiten Ableitung negativiert.

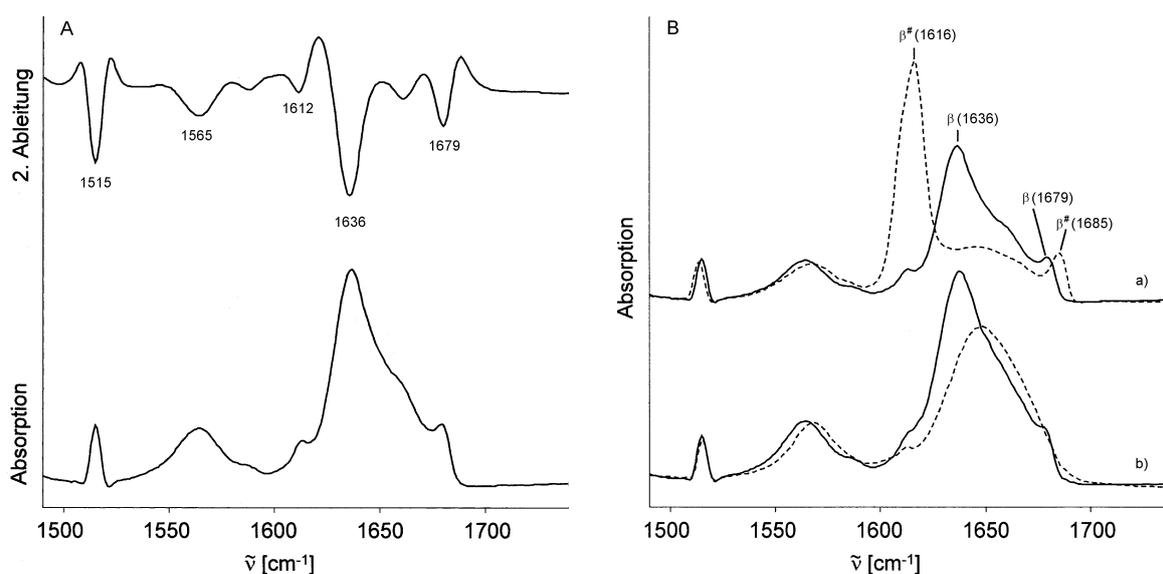


Abbildung 4.22: FT-IR Spektren; (A) von N-WW bei 10°C; (B) von a) N-WW und b) 5QN-WW; nativ bei 10°C (durchgezogene Linie) und denaturiert bei 90°C (gestrichelte Linie)

N-WW zeigte im Sekundärstruktur-sensitiven Amid I-Bereich eine starke Bande bei 1636 cm^{-1} und eine schwache hochfrequente Komponente bei 1679 cm^{-1} , wobei beide Banden ein Indiz für antiparallele β -Faltblatt-Struktur sind [60, 37, 3]. Banden im Bereich von 1500 cm^{-1} bis 1612 cm^{-1} sind der Absorption von Aminosäure-Seitenketten zuzuordnen [22]. Im Spektrum von N-WW zeigten die Tyrosine Absorptionsbanden bei 1515 cm^{-1} und 1612 cm^{-1} (C-C-Streckschwingungen des Aromaten) während die Bande bei 1565 cm^{-1} (asymmetrische COO^- -Streckschwingung) aus der Absorption von Glutaminsäureresten resultierte. Der Vorteil der FT-IR-Experimente lag darin begründet, daß der reine β -Faltblatt-Strukturanteil gemessen werden konnte, während in den CD-Spektren das Signal der β -Faltblatt-Struktur von der Absorption der Tryptophane stark überlagert wurde. Ein weiterer Vorteil bestand darin, daß neben dem Amid I-Bereich möglicherweise auch das Verhalten der Seitenketten während der Denaturierung verfolgt werden kann. Es zeigte sich jedoch bei der

thermischen Entfaltung von N-WW (Abbildung 4.22 B), daß dieses Peptid aufgrund der in der FT-IR-Spektroskopie benötigten hohen Konzentrationen von 2 mM ab ca 70 °C irreversibel aggregierte. Dies konnte aus den Banden im Amid I-Bereich bei 1616 cm⁻¹ und 1685 cm⁻¹ abgeleitet werden, die das Spektrum dominierten und charakteristisch für intermolekulare Faltblatt-Strukturen ($\beta^{\#}$) sind [60, 37, 3].

Die Untersuchung einiger anderer FBP28 WW-Varianten ergab, daß im Gegensatz zu N-WW oder 2AN-WW hauptsächlich 5AN-WW und überraschenderweise auch das 5QN-WW Peptid kein Aggregationsverhalten zeigte, sondern eine breite Bande bei 1648 cm⁻¹ aufwies (Abbildung 4.22 B), die charakteristisch für eine ungeordnete Struktur ist [60, 37, 3]. Möglicherweise sind besonders die hydrophoben Reste Tyr²¹ und Leu²⁶, die in den Fünffachvarianten ebenfalls substituiert waren, beim Aufschmelzen der Struktur für Aggregationseffekte verantwortlich. Aggregation von β -Faltblatt-strukturierten Peptiden wurde häufig beobachtet und hemmte lange Zeit die Analyse ihrer strukturstabilisierenden Faktoren [118]. Auch für die FBP28 WW-Domäne wurde bereits das Aggregationsverhalten bis hin zur Bildung von geordneten fibrillären Strukturen unter verschiedenen Bedingungen beschrieben [39]. Aufgrund dieser starken Banden für intermolekulare Faltblatt-Struktur konnten die dadurch beeinflussten Entfaltungskurven nur schwer bzw. gar nicht ausgewertet werden. Daher war der Einsatz der FT-IR-Spektroskopie zur Untersuchung der Stabilität der N-WW-Varianten nur sehr eingeschränkt möglich.

In Analogie zu den CD-Daten zeigten ebenfalls die Entfaltungskurven über den Amid I-Bereich der Infrarotmessungen einen breiten Übergangsbereich (Abbildung 4.23 A), der eine genaue Ermittlung der thermodynamischen Parameter über eine Kurvenanpassung verhinderte.

Eine zweite Möglichkeit bot die Auswertung der durch die Änderung des Mikromilieus bedingten Verschiebung der ausgeprägten, schmalen Tyrosin-Bande. Für diese Absorptionsbande der C-C Streckschwingung des aromatischen Ringsystems haben bereits einige Arbeiten gezeigt, daß sich die Frequenz der Bande während der Entfaltung und Aggregation von Proteinen auf charakteristische Weise verschiebt und folglich sehr gut auswerten läßt [38, 156, 149]. Die Tyrosin-Bande wird daher als sensitiver Marker für Änderungen sowohl in der Sekundär- als auch in der Tertiärstruktur von Proteinen angesehen.

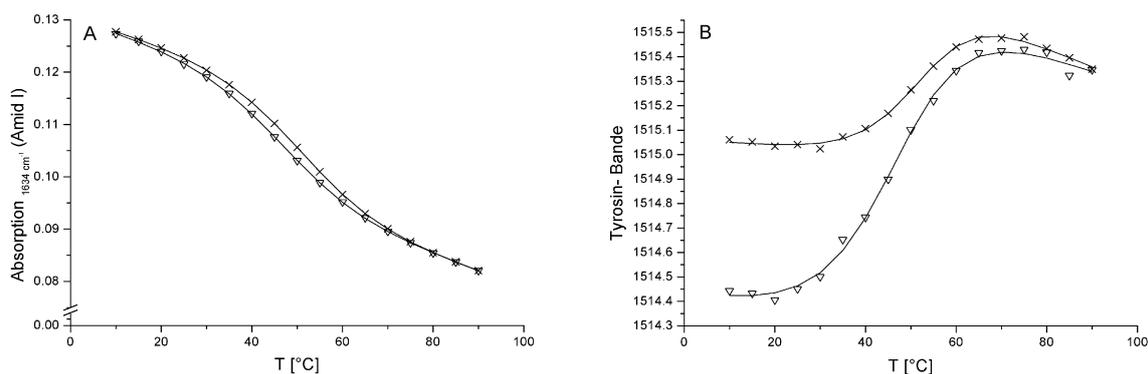


Abbildung 4.23: Thermische Entfaltung von 5QN-WW (x) und 5Q2FN-WW(∇); (A) Auswertung des Amid I-Bereichs; (B) Auswertung der Tyrosin-Bande

Die Auswertung der Tyrosin-Bande von 5QN-WW ist in Abbildung 4.23 B dargestellt. Sie zeigte ausgeprägtere Bereiche für den nativen und denaturierten Zustand des Peptids sowie einen wesentlich eindeutigeren Übergangsbereich, verglichen mit der Auswertung der Amid I-Bande. Das Abfallen der Kurve im nativen und denaturierten Bereich ist einem generellen Effekt der Temperatur zuzuordnen [38].

Da die FBP28 WW-Domäne insgesamt vier Tyrosinreste enthält, die, wie eingangs bereits erwähnt, unterschiedliche Positionen und stabilisierende Eigenschaften haben, eröffnete sich die Möglichkeit, durch Mutation der übrigen Tyrosine zu Phenylalanin das Verhalten eines einzelnen Tyrosins während der Entfaltung gezielt zu untersuchen. Auf diesem Wege kann eine Ortsauflösung erzielt werden, die üblicherweise nur mit der NMR-Spektroskopie zu erreichen ist. In 5Q2FN-WW (Tabelle 4.9) wurden alle Tyrosine mit Ausnahme von Tyr¹⁹ zu Phenylalanin mutiert und mittels FT-IR-Spektroskopie mit 5QN-WW verglichen (Abbildungen 4.23 A und B). Auch diese Variante zeigte bei der Denaturierung unter FT-IR-Bedingungen eine reversible Entfaltung ohne Aggregationstendenz, jedoch wurde die Stabilität dieses Peptids aufgrund der Substitution der Tyrosine durch Phenylalanine leicht beeinträchtigt. Der Verlauf der Tyrosin-Bande, der jetzt nur noch Tyr¹⁹ abbildet, umspannte einen größeren Wellenzahlbereich und deutete auf eine stärkere Änderung der Umgebung des Tyr¹⁹ hin.

Um substitutionsbedingte Einflüsse auf die Stabilität der Domäne zu vermeiden, aber dennoch ortsspezifische Informationen über die Tyrosin-Bande zu erhalten, wurde ein ¹³C₁(4) markiertes Tyrosin eingebaut. In der Literatur wurde bereits beschrieben, daß eine solche Markierung die Tyrosin-Bande um 10 cm⁻¹ zu niedrigeren Frequenzen verschiebt [51]. Dieser Effekt sollte hierbei ausgenutzt werden.

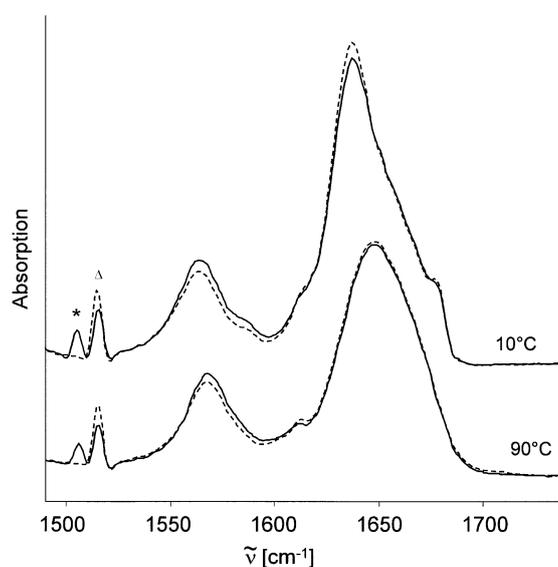


Abbildung 4.24: FT-IR Absorptionsspektren von 5QN-WW (gestrichelte Linie) und *Y¹⁹ 5QN-WW (durchgezogene Linie). Δ markiert die Tyrosin-Bande bei 1515 cm⁻¹, * die Bande von ¹³C₁(4)-Tyr bei 1505 cm⁻¹

Analog zur 5Q2FN-WW-Variante wurde zunächst markiertes ¹³C₁(4)-Tyr in Position 19 (Tabelle 4.9) des Solvent-exponierten hydrophoben Kerns in FBP28 WW über Festphasensynthese eingesetzt. Die Infrarotspektren dieses Peptides zeigten gegenüber 5QN-WW erwartungsgemäß eine Abnahme der Intensität der Tyr-Bande der aromatischen Ring C-C-Streckschwingung bei 1515 cm⁻¹ sowie eine neue um 10 cm⁻¹ verschobene Bande des markierten Tyrosins bei 1505 cm⁻¹, welche sich sowohl im gefalteten, nativen Zustand bei 10 °C als auch im denaturierten Zustand bei 90 °C klar von der Frequenz der übrigen Tyrosine 11 und 20 unterscheiden ließ (Abbildung 4.24).

Parallel dazu wurde in einem zweiten Peptid Tyr¹¹ ¹³C₁(4)-markiert eingesetzt (Tabelle 4.9), das anhand von NMR-Analysen von WW-WT [83] und N-WW stärker Solvent-exponiert als Tyr¹⁹ ist und daher während der Entfaltung der Domäne lediglich eine geringe Änderung *Tyr-Bande zeigen sollte.

Wie die Auswertungen der temperaturinduzierten Entfaltung von *Y¹¹ 5QN-WW und *Tyr¹⁹ 5QN-WW darstellen (Abbildung 4.25 A)), konnte ein stark unterschiedliches Verhalten der beiden markierten Tyr-Banden beobachtet werden.

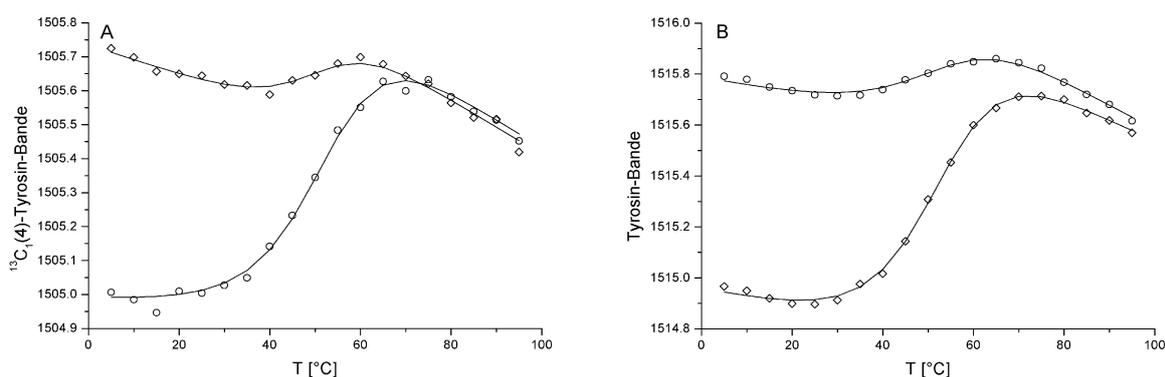


Abbildung 4.25: Verschiebung des Maximums der Tyrosin-Banden während der thermischen Entfaltung von *Y¹⁹ 5QN-WW (o) und *Y¹¹ 5QN-WW (◊)

Während die *Tyr¹¹-Bande erwartungsgemäß lediglich eine geringe Frequenzänderung aufwies, zeigte sich für *Tyr¹⁹ eine relativ starke Verschiebung um $\approx 0,6 \text{ cm}^{-1}$ aufgrund der Entfaltung. Die geringe Verschiebung der *Tyr¹¹-Bande in *Y¹¹ 5QN-WW um weniger als $0,2 \text{ cm}^{-1}$ war jedoch vergleichbar mit dem Verhalten der unmarkierten Tyr-Bande (Tyr¹¹ und Tyr²⁰) in *Y¹⁹ 5QN-WW (Abbildung 4.25 B). Das ließ ein ähnliches Verhalten von Tyr¹¹ und Tyr²⁰ während der temperaturinduzierten Entfaltung vermuten und führt zu dem Schluß, daß sich das Mikromilieu von Tyr¹⁹ im Vergleich zu Tyr¹¹ bzw. Tyr²⁰ im nativ gefalteten Zustand von FBP28 WW stark unterscheiden muß.

Eine starke Verschiebung von Tyrosin-Banden während der Entfaltung ist gewöhnlich ein Indiz für eine Verstärkung der Tyrosin-O-H Bindung, die durch das Lösen von Wasserstoffbrückenbindungen der Tyrosin-OH-Gruppe hervorgerufen wird [38, 156]. Jedoch gaben bisherige NMR-Untersuchungen an nativ gefaltetem FBP28 WW keinen Hinweis auf das Bestehen einer solchen Wechselwirkung. Darüber hinaus konnte im vorangegangenen Abschnitt 4.3.1 durch Einsatz von Cyclohexylalanin in Position 19 und 1-Methyl-Tryptophan in Position 30 die Existenz einer solchen Wasserstoffbrückenbindung nicht bestätigt werden. Offensichtlich tragen auch andere Effekte neben Wasserstoffbrückenbindungen zu einer entfaltungsinduzierten Verschiebung der aromatischen Ringschwingung von Tyrosin bei, wie z.B. Veränderungen der π - π -Interaktionen des Tyrosin-Rings zu benachbart gelegenen konjugierten Systemen anderer Aminosäurereste [156]. Daher könnte die starke Verschiebung der Banden-Position für Tyr¹⁹ aufgrund der Entfaltung der Domäne ein Hinweis auf das Lösen einer π - π -Wechselwirkung der Tyrosin-Seitenkette zu dem Indolring von Trp³⁰ sein, welcher nach den NMR-Strukturen von 5QN-WW, N-WW [53] und WW-WT [83] in der Nähe liegt. Ferner könnte die *Tyr-Bande von Tyr¹⁹ für zukünftige Arbeiten als Sonde dienen, um gezielt Wechselwirkungen von β -Strang 2 mit Strang 3 zu studieren.

Tabelle 4.11: Temperaturstabilität der markierten und unmarkierten 5Q-FBP28 WW-Varianten

Peptid	Amid I Bande		*Tyr-Bande		Tyr-Bande	
	T_m [°C]	r	T_m [°C]	r	T_m [°C]	r
5QN-WW	47,6	1,000	-	-	52,4	0,997
5Q2FN-WW	43,2	1,000	-	-	45,4	0,997
*Y ¹⁹ 5QN-WW	-	-	51,9	0,997	52,1	0,978
*Y ¹¹ 5QN-WW	-	-	50,9	0,969	51,6	0,999

Die errechneten Werte der Übergangstemperatur T_m für diese 5QN-WW Varianten (Tabelle 4.11) lagen mit Ausnahme der Auswertung über die Amid I-Bande alle bei $\approx 52^\circ\text{C}$. Die Amid I-Bande lieferte niedrigere Schmelztemperaturen, wahrscheinlich bedingt durch den flachen, breiten Übergangsbereich, der zu Ungenauigkeiten in der Kurvenanpassung geführt haben könnte. Demgegenüber war der Übergangsbereich der Tyrosin-Banden wesentlich klarer definiert, wodurch diese Kurven sich sicherer auswerten ließen.

Die einzelnen Auswertungen der beiden Tyrosin-Banden aus der Gleichgewichtsentfaltung für *Y¹⁹ 5QN-WW und *Y¹¹ 5QN-WW lieferten alle den gleichen Wert bei $\approx 52^\circ\text{C}$ und ließen keine ortsspezifischen Unterschiede erkennen. Dem zufolge verläuft die Entfaltung des Peptids tatsächlich kooperativ. Die Abweichung des Wertes für die *Tyr-Bande von *Y¹¹ 5QN-WW ist wahrscheinlich ebenfalls auf Ungenauigkeiten in der Kurvenanpassung zurückzuführen, die durch eine sehr geringe Verschiebung der Bande um $0,1\text{ cm}^{-1}$ im Übergangsbereich erschwert wurde.

Der Vergleich der Entfaltungsverläufe einzelner Tyr-Banden enthüllte, daß im Bereich der Basislinie für nativ gefaltete Domänen mit Ausnahme von *Tyr¹⁹ alle übrigen Banden eine stetig abfallende Gerade zeigten, die einem generellen Temperatureffekt auf die Tyrosin-Bande entstammt. Für *Tyr¹⁹ kann ein solcher Abfall nicht beobachtet werden. Vielmehr könnte der Verlauf dieser Bande zwischen 5°C und 30°C durch eine Veränderung in der unmittelbaren Umgebung von Tyr¹⁹ bedingt sein und in einer Verzerrung der π - π -Interaktion zwischen dieser Seitenkette und dem Trp³⁰-Rest begründet liegen. Im Einklang mit Molekulardynamik-Simulationen [58, 41], die zuerst den Strukturverlust in β -Strang 3 beschreiben

bevor die Entfaltung von Strang 1 und 2 eintritt, könnten diese Ergebnisse auf einen frühen Entfaltungsschritt in 5QN-WW hinweisen.

Die hier erhaltenen Ergebnisse der temperaturinduzierten Entfaltung von 5QN-WW im Gleichgewicht konnten zeigen, daß sich durch ortsspezifische Isotopenmarkierung signifikante Unterschiede in des Mikromilieus von Tyr¹⁹ im Vergleich zu Tyr¹¹ und Tyr²⁰ abbilden lassen und parallel dazu lokale Konformationsänderungen in unterschiedlichen Regionen der Domäne verfolgt werden können. In zukünftigen Arbeiten könnte diese Ortsauflösung auch für Faltungskinetiken eingesetzt werden, die Hinweise auf eine zeitliche Abfolge der Faltung einzelner Bereiche in der β -Faltblatt-Struktur und möglicherweise auf den Faltungsmechanismus liefern.

5 Zusammenfassung und Ausblick

WW-Domänen sind mit 38-40 Aminosäuren kleine Proteinmodule, die eine kompakte, dreisträngige, antiparallele β -Faltblatt-Struktur annehmen. Aufgrund ihrer Stabilität und einer hohen Toleranz für Aminosäure-Substitutionen in vielen Positionen eignen sich diese Domänen sehr gut als Modellpeptide für Faltungs- und Stabilitätsstudien. In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue chemische Synthesestrategie mittels Festphasenpeptidsynthese (SPPS) für die FBP28 WW-Domäne erarbeitet sowie die Bedeutung der Wechselwirkungen von Aminosäure-Seitenketten zur Proteinstabilisierung mit Hilfe biophysikalischer Methoden untersucht.

Bei der Festphasensynthese von FBP28 WW-abgeleiteten Varianten zeigten sich zwei Kernprobleme. Zum einen galt es, die Aspartimidbildung in Loop 1 zu unterdrücken, zum anderen mußten unvollständige Kupplungen in β -Strang 1 und 2 vermieden werden, die auf Aggregationseffekte während der Peptidsynthese zurückzuführen sind ("difficult sequences"). Um die Strukturbildung während der Synthese zu vermeiden, wurden verschiedene Aminosäure-Bausteine zur reversiblen Modifikation der Peptidkette eingesetzt. Hierbei zeigte sich die Strategie über Oxazolidin-Dipeptidmodule (Pseudo-Proline) zur Herstellung von FBP28 WW sehr erfolgreich und erzielte eine wesentliche Verbesserung der Syntheseeffizienz. Weiterhin konnte FBP28 WW auch über den Einsatz einer Depsi-Bindung als Alternative zu Pseudo-Prolinen erfolgreich hergestellt werden. Die Vermeidung der Aspartimidbildung gelang durch Mutation der Asparaginsäure zu Asparagin unter Beibehaltung der typischen WW-Konformation, jedoch führte diese Substitution zu einer leichten Destabilisierung der Domäne. Im Gegensatz zur rekombinanten Synthese ermöglichte die Festphasenpeptidsynthese den Einbau von nicht-natürlichen Aminosäuren, um Wechselwirkungen neben den Mutationsstudien auch auf Einzelatom-Ebene untersuchen zu können.

β -Faltblatt-Strukturen zeigen charakteristische Wasserstoffbrückenbindungen des Peptidrückgrats und werden insbesondere durch hydrophobe Interaktionen der Aminosäure-Seitenketten stabilisiert. Anhand der FBP28 WW-Domäne wurde die Bedeutung der nativen, strukturstabilisierenden Interaktionen von Aminosäure-Seitenketten untersucht und darüber hinaus studiert, in welchem Maße eine Stabilisierung durch hydrophilere Seitenketten erzielt

werden kann. Dazu wurden vormals hydrophobe Wechselwirkungen in fünf selektierten Positionen (9, 21, 23, 26, 28) durch Mutation zu Alanin entfernt bzw. Aminosäurenreste durch das potentiell Wasserstoffbrücken-bildende Glutamin ersetzt. Es konnte gezeigt werden, daß besonders eine hydrophobe Wechselwirkung (Tyr²¹/ Leu²⁶) des ausgewählten Bereichs essentiell für die Faltung und Stabilität der Domäne ist. Überraschend war dagegen, daß eine Substitution der Seitenketten durch Glutamin das Fehlen dieser Wechselwirkung partiell kompensieren kann und selbst bei einer Fünffachmutation die typischen WW-Konformation erhalten bleibt. Die Substitution durch Glutamine verringerte jedoch die thermodynamische Stabilität des Modells und bedingte eine Abnahme der Faltungsgeschwindigkeit um den Faktor 3. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß Polyglutaminstränge in einem einfachen, 14-19 Aminosäuren umfassenden Modell alleinig keine β -Faltblatt-Strukturierung bewirkten, sondern durch geeignete hydrophobe Wechselwirkungen (Einbau von Tryptophan) ergänzt werden mußten.

Die optimierte Synthesestrategie für WW-Domänen ermöglichte den Einbau von nicht-natürlichen Aminosäuren (1-Methyl-Tryptophan, 5-Fluor-Tryptophan und Cyclohexylalanin) in die Sequenz, welche den strukturstabilisierenden Effekt der stark konservierten aromatischen Aminosäuren auf Einzelatom-Ebene beleuchten sollten. Die meisten der strukturmodifizierten Analoga wurden unter dem Aspekt der Untersuchung einer potentiellen Wasserstoffbrückenbindung und gleichzeitig einer leicht erhöhten Hydrophobizität der beiden Tryptophane eingesetzt. Sie zeigten jedoch nur geringen Einfluß auf die Stabilität der Domäne. Dies war gerade für den Einbau von 1-Methyl-Tryptophan in Position 8 unerwartet, da Trp⁸ essentiell für die Stabilität der Domäne und gemäß der NMR-Struktur Teil eines kompakten hydrophoben Clusters (Trp⁸/ Tyr²⁰/ Pro³³) ist, dessen Wechselwirkungen durch die zusätzliche Methylgruppe gestört werden sollte. Unerwartet war auch, daß eine Substitution des hoch konservierten Tyrosins in Position 19 durch das nicht aromatische Cyclohexylalanin eine Zunahme der Stabilität bewirkte. Demnach beruht die Wechselwirkung des Tyrosins auf seinem hydrophoben Charakter zusammen mit seinem Volumenanspruch und nicht unbedingt auf dem aromatischen Ringsystem der Seitenkette.

Weiterhin eröffnete sich die Möglichkeit, gezielt ein ¹³C₁(4) markiertes Tyrosin in unterschiedlichen Positionen über chemische Peptidsynthese zu integrieren, wodurch eine Verschiebung der Tyrosin-Bande im FT-IR-Spektrum erreicht wurde. Somit konnte mittels FT-IR-Spektroskopie das Verhalten einzelner Tyrosine ortsspezifisch studiert und wesentliche Unterschiede im Mikromilieu von Tyr¹⁹ im Vergleich zu Tyr¹¹ und Tyr²⁰ beobachtet werden.

In dieser Arbeit konnte erfolgreich demonstriert werden, daß Glutamin-Seitenketten β -Struktur-stabilisierende Wechselwirkungen ausbilden, die eine essentielle hydrophobe Interaktion in FBP28 WW partiell ersetzen. Erstaunlicherweise blieb selbst bei einer Glutamin-Fünffachmutante die Konformation der Domäne erhalten. Jedoch ist unklar geblieben welcher Art die strukturstabilisierenden Wechselwirkungen der Glutamin-Seitenketten sind und sollten über zukünftige NMR-Studien aufgeklärt werden.

Nachdem eine Strategie zur SPPS von WW Domänen erarbeitet wurde mit deren Hilfe erfolgreich erste nicht-natürliche Aminosäuren zur Untersuchung von Struktur und Stabilität von FBP28 WW eingesetzt werden konnten, eröffnet sich für zukünftige Arbeiten ein umfangreicherer Einsatz nicht-natürlicher Bausteine. Beispielsweise wäre interessant zu untersuchen, ob eine Mehrfachsubstitution durch Cyclohexylalanin zu einer weiteren Stabilisierung der Domäne führt. Ferner könnten nicht-aromatische Tryptophan-Analoga das Erfordernis des aromatischen Ringsystems in diesen Positionen beleuchten.

Die hier durch ein isopenmarkiertes Tyrosin erzielte Ortsauflösung für die FT-IR-Spektroskopie kann ebenfalls für zeitaufgelöste FT-IR-Studien ausgenutzt werden, um die Abfolge der Faltung einzelner Bereiche der WW-Domäne zu untersuchen. Alternativ dazu könnten auch Tryptophan-Analoga mit veränderten Fluoreszenzeigenschaften als lokale Sonden für Stabilitäts- und Faltungsstudien mittels Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt werden. Von Vorteil wäre hierbei die wesentlich niedrigere benötigte Peptidkonzentration, welche die Aggregations-tendenz des Modells stark herabgesetzt und eventuell die Untersuchung einer größeren Zahl von FBP28 WW-Varianten ermöglicht.

Literaturverzeichnis

- [1] Abrahamson, M. & Grubb, A. (1994) Increased body temperature accelerates aggregation of the Leu-68- γ Gln mutant cystatin C, the amyloid-forming protein in hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4):1416–1420.
- [2] Alexander, P., Fahnestock, S., Lee, T., Orban, J., & Bryan, P. (1992) Thermodynamic analysis of the folding of the streptococcal protein-G IgG-binding domains B1 and B2: why small proteins tend to have high denaturation temperatures. *Biochemistry* **31**(14):3597–3603.
- [3] Barth, A. & Zscherp, C. (2002) What vibrations tell us about proteins. *Quart Rev Biophys* **34**(4):369–430.
- [4] Bayer, E. (1991) Towards the chemical synthesis of proteins. *Angew Chem Int Ed* **30**(2):113–129.
- [5] Bedford, J., Hyde, C., Johnson, T., Jun, W., Owen, D., Quibell, M., & Sheppard, R. C. (1992) Amino-acid structure and difficult sequences in solid-phase peptide-synthesis. *Int J Pept Protein Res* **40**(3-4):300–307.
- [6] Bedford, M. T., Chan, D. C., & Leder, P. (1997) FBP WW domains and the abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands. *EMBO J* **16**(9):2376–2383.
- [7] Bednarek, A. K., Laffin, K. J., Daniel, R. L., Liao, Q., Hawkins, K. A., & Aldaz, C. M. (2000) WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res* **60**(8):2140–2145.
- [8] Beyermann, M. & Bienert, M. (1992) Synthesis of difficult peptide sequences - a comparison of Fmoc-and Boc-technique. *Tetrahedron Lett* **33**(26):3745–3748.

- [9] Blaakmeer, J., Tijsselkassen, T., & Tesser, G. I. (1991) Enhancement of solubility by temporary dimethoxybenzyl-substitution of peptide-bonds - towards the synthesis of defined oligomers of alanine and of lysyl-glutamyl-glycine. *Int J Pept Protein Res* **37**(6):556–564.
- [10] Blanco, F. J., Jimenez, M. A., Pineda, A., Rico, M., Santoro, J., & Nieto, J. L. (1994) NMR solution structure of the isolated N-terminal fragment of protein-G B1 domain. evidence of trifluoroethanol induced native-like beta-hairpin formation. *Biochemistry* **33**(19):6004–6014.
- [11] Bork, P. & Sudol, M. (1994) The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci* **19**(12):531–533.
- [12] Carpino, L. A., Chao, H. G., Ghassemi, S., Mansour, E. M. E., Riemer, C., Warrass, R., Sadataalae, D., Truran, G. A., Imazumi, H., ElFaham, A., Ionescu, D., Ismail, M., Kowaleski, T. L., Han, C. H., Wenschuh, H., Beyermann, M., Bienert, M., Shroff, H., Albericio, F., Triolo, S. A., Sole, N. A., & Kates, S. A. (1995) Novel carboxylic-acid and carboxamide protective groups based on the exceptional stabilization of the cyclopropylmethyl cation. *J Org Chem* **60**(24):7718–7719.
- [13] Carpino, L. A., ElFaham, A., Minor, C. A., & Albericio, F. (1994) Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide-synthesis. *J Chem Soc, Chem Commun* (2):201–203.
- [14] Carpino, L. A., Imazumi, H., El-Faham, A., Ferrer, F. J., Zhang, C. W., Lee, Y. S., Foxman, B. M., Henklein, P., Hanay, C., Mügge, C., Wenschuh, H., Klose, J., Beyermann, M., & Bienert, M. (2002) The uronium/guanidinium peptide coupling reagents: Finally the true uronium salts. *Angewandte Chemie-International Edition* **41**(3):442–445.
- [15] Carpino, L. A., Ionescu, D., Faham, A. El, Henklein, P., Wenschuh, H., Bienert, M., & Beyermann, M. (1998) Protected amino acid chlorides vs protected amino acid fluorides: Reactivity comparisons. *Tetrahedron Lett* **39**(3-4):241–244.
- [16] Carpino, L. A., Ismail, M., Truran, G. A., Mansour, E. M. E., Iguchi, S., Ionescu, D., Faham, A. El, Riemer, C., & Warrass, R. (1999) The 1,1-dioxobenzo[b]thiophene-2-ylmethoxycarbonyl (Bsmoc) amino-protecting group. *J Org Chem* **64**(12):4324–4338.
- [17] Carpino, L. A., Krause, E., Sferdean, C. D., Schumann, M., Fabian, H., Bienert, M., & Beyermann, M. (2004) Synthesis of 'difficult' peptide sequences: application of

- a depsipeptide technique to the Jung-Redemann 10- and 26-mers and the amyloid peptide a beta(1-42). *Tetrahedron Lett* **45**(40):7519–7523.
- [18] Chakrabartty, A. & Baldwin, R. L. (1995) Stability of alpha-helices. *Adv Protein Chem* **46**:141–176.
- [19] Chan, D. C., Bedford, M. T., & Leder, P. (1996) Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *EMBO J* **15**(5):1045–1054.
- [20] Chang, C. D. & Meienhofer, J. (1978) Solid-phase peptide-synthesis using mild base cleavage of n-alpha-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids, exemplified by a synthesis of dihydrosomatostatin. *Int J Pept Protein Res* **11**(3):246–249.
- [21] Chen, S., Berthelie, V., Hamilton, J. B., O’Nuallain, B., & Wetzel, R. (2002) Amyloid-like features of polyglutamine aggregates and their assembly kinetics. *Biochemistry* **41**(23):7391–7399.
- [22] Chirgadze, Y. N., Fedorov, O. V., & Trushina, N. P. (1975) Estimation of amino-acid residue side-chain absorption in infrared-spectra of protein solutions in heavy-water. *Biopolymers* **14**(4):679–694.
- [23] Chou, P. Y. & Fasman, G. D. (1974) Conformational parameters for amino-acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* **13**(2):211–222.
- [24] Ciani, B., Jourdan, M., & Searle, M. S. (2003) Stabilization of beta-hairpin peptides by salt bridges: role of preorganization in the energetic contribution of weak interactions. *J Am Chem Soc* **125**(30):9038–9047.
- [25] Cochran, A. G., Skelton, N. J., & Starovasnik, M. A. (2001) Tryptophan zippers: Stable, monomeric beta-hairpins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(10):5578–5583.
- [26] Crane, J. C., Köpf, E. K., Kelly, J. W., & Gruebele, M. (2000) Mapping the transition state of the WW domain beta-sheet. *J Mol Biol* **298**(2):283–292.
- [27] Creighton, T. E. (1993) *Proteins: Structures and molecular properties*. W.H. Freeman and Co., New York. 2. Auflage.
- [28] Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., & Brenner, S. E. (2004) WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research* **14**(6):1188–1190.

- [29] de Alba, E. (1999) De novo design of a monomeric three-stranded antiparallel beta-sheet. *Prot Sci* **8**(4):175–183.
- [30] de Alba, E., Jimenez, M. A., & Rico, M. (1997) Turn residue sequence determines beta-hairpin conformation in designed peptides. *J Am Chem Soc* **119**(1):175–183.
- [31] de Alba, E., Jimenez, M. A., Rico, M., & Nieto, J. L. (1996) Conformational investigation of designed short linear peptides able to fold into beta-hairpin structures in aqueous solution. *Fold Des* **1**(2):133–144.
- [32] Deechongkit, S., Nguyen, H., Powers, E. T., Dawson, P. E., Gruebele, M., & Kelly, J. W. (2004) Context-dependent contributions of backbone hydrogen bonding to beta-sheet folding energetics. *Nature* **430**(6995):101–105.
- [33] Dölling, R., Beyermann, M., Haenel, J., Kernchen, F., Krause, E., Franke, P., Brudel, M., & Bienert, M. (1994) Base-mediated side reactions on Asp(OtBu)-X sequences in Fmoc-chemistry. *Peptides* pages 244–245.
- [34] Dölling, R., Beyermann, M., Haenel, J., Kernchen, F., Krause, E., Franke, P., Brudel, M., & Bienert, M. (1994) Piperidine-mediated side product formation for Asp(OBu(t))-containing peptides. *J Chem Soc, Chem Commun* (7):853–854.
- [35] Espinosa, J. F., Munoz, V., & Gellman, S. H. (2001) Interplay between hydrophobic cluster and loop propensity in beta-hairpin formation. *J Mol Biol* **306**(3):397–402.
- [36] Espinosa, J. F., Syud, F. A., & Gellman, S. H. (2002) Analysis of the factors that stabilize a designed two-stranded antiparallel beta-sheet. *Protein Sci* **11**(6):1492–1505.
- [37] Fabian, H. & Mäntele, W. (2002) Infrared Spectroscopy of Proteins, in Handbook of Vibrational Spectroscopy (Hrsg.: Chalmers, J.M und Griffiths, P.R.), Bd. 5, S. 3399–3425. John Wiley and Sons Ltd., Chichester.
- [38] Fabian, H., Schultz, C., Backmann, J., Hahn, U., Saenger, W., Mantsch, H. H., & Naumann, D. (1994) Impact of point mutations on the structure and thermal stability of ribonuclease T1 in aqueous solution probed by fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* **33**(35):10725–10730.
- [39] Ferguson, N., Berriman, J., Petrovich, M., Sharpe, T. D., Finch, J. T., & Fersht, A. R. (2003) Rapid amyloid fiber formation from the fast-folding WW domain FBP28. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(17):9814–9819.

- [40] Ferguson, N., Johnson, C. M., Macias, M., Oschkinat, H., & Fersht, A. (2001) Ultrafast folding of WW domains without structured aromatic clusters in the denatured state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23):13002–13007.
- [41] Ferguson, N., Pires, J. R., Toepert, F., Johnson, C. M., Pan, Y. P., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J., Daggett, V., Oschkinat, H., & Fersht, A. (2001) Using flexible loop mimetics to extend phi-value analysis to secondary structure interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23):13008–13013.
- [42] Fields, G. B. & Fields, C. G. (1991) Solvation effects in solid-phase peptide-synthesis. *J Am Chem Soc* **113**(11):4202–4207.
- [43] Fields, G. B. & Noble, R. L. (1990) Solid-phase peptide-synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-acids. *Int J Pept Protein Res* **35**(3):161–214.
- [44] Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**(2):319–326.
- [45] Griffiths-Jones, S. R., Sharman, G. J., Maynard, A. J., & Searle, M. S. (1998) Modulation of intrinsic phi,psi propensities of amino acids by neighbouring residues in the coil regions of protein structures: NMR analysis and dissection of a beta-hairpin peptide. *J Mol Biol* **284**(5):1597–1609.
- [46] Grishina, I. B. & Woody, R. W. (1994) Contributions of tryptophan side chains to the circular dichroism of globular proteins: exciton couplets and coupled oscillators. *Faraday Discuss* (99):245–262.
- [47] Haack, T. & Mutter, M. (1992) Serine derived oxazolidines as secondary structure disrupting, solubilizing building-blocks in peptide-synthesis. *Tetrahedron Lett* **33**(12):1589–1592.
- [48] Haque, T. S. & Gellman, S. H. (1997) Insights on beta-hairpin stability in aqueous solution from peptides with enforced type I' and type II' beta-turns. *J Am Chem Soc* **119**(9):2303–2304.
- [49] Haris, P. I. & Chapman, D. (1995) The conformational-analysis of peptides using fourier-transform IR spectroscopy. *Biopolymers* **37**(4):251–263.
- [50] Henklein, P. (2000). N-alpha-Arensulfonyl-Aminosäurechloride - Kupplung sterisch stark gehinderter Komponenten in der Peptidsynthese. Dissertation, Humboldt Universität Berlin.

- [51] Hienerwadel, R., Boussac, A., Breton, J., Diner, B. A., & Berthomieu, C. (1997) Fourier transform infrared difference spectroscopy of photosystem II tyrosine D using site-directed mutagenesis and specific isotope labeling. *Biochemistry* **36**(48):14712–14723.
- [52] Holmgren, S. K., Taylor, K. M., Bretscher, L. E., & Raines, R. T. (1998) Code for collagen's stability deciphered. *Nature* **392**(6677):666–667.
- [53] Holtmann, J. H., Fossi, M., & Oschkinat, H. unveröffentlichte Ergebnisse.
- [54] Houben-Weyl. (2002) *Methods of Organic Chemistry*, Band E 22a, S. 60-61. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 4. Auflage.
- [55] Hu, H., Columbus, J., Zhang, Y., Wu, D. Y., Lian, L. B., Yang, S., Goodwin, J., Luczak, C., Carter, M., Chen, L., James, M., Davis, R., Sudol, M., Rodwell, J., & Herrero, J. J. (2004) A map of WW domain family interactions. *Proteomics* **4**(3):643–655.
- [56] Huang, X., Poy, F., Zhang, R., Joachimiak, A., Sudol, M., & Eck, M. J. (2000) Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nat Struct Biol* **7**(8):634–638.
- [57] Hyde, C., Johnson, T., Owen, D., Quibell, M., & Sheppard, R. C. (1994) Some difficult sequences made easy - a study of interchain association in solid-phase peptide-synthesis. *Int J Pept Protein Res* **43**(5):431–440.
- [58] Ibragimova, G. T. & Wade, R. C. (1999) Stability of the beta-sheet of the WW domain: A molecular dynamics simulation study. *Biophys J* **77**(4):2191–2198.
- [59] Imperiali, B., Fisher, S. L., Moats, R. A., & Prins, T. J. (1992) A conformational study of peptides with the general structure Ac-L-Xaa-Pro-D-Xaa-L-Xaa-NH₂ - spectroscopic evidence for a peptide with significant beta-turn character in water and in dimethyl-sulfoxide. *J Am Chem Soc* **114**(9):3182–3188.
- [60] Jackson, M. & Mantsch, H. H. (1995) The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **30**(2):95–120.
- [61] Jackson, S. E. & Fersht, A. R. (1991) Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. evidence for a two-state transition. *Biochemistry* **30**(43):10428–10435.
- [62] Jäger, M., Nguyen, H., Crane, J. C., Kelly, J. W., & Gruebele, M. (2001) The folding mechanism of a beta-sheet: The WW domain. *J Mol Biol* **311**(2):373–393.

- [63] Jiang, X., Kowalski, J., & Kelly, J. W. (2001) Increasing protein stability using a rational approach combining sequence homology and structural alignment: Stabilizing the WW domain. *Protein Sci* **10**(7):1454–1465.
- [64] Johnson, T., Quibell, M., Owen, D., & Sheppard, R. C. (1993) A reversible protecting group for the amide bond in peptides - use in the synthesis of difficult sequences. *J Chem Soc, Chem Commun* (4):369–372.
- [65] Jr, D. L. Minor & Kim, P. S. (1994) Measurement of the beta-sheet-forming propensities of amino acids. *Nature* **367**(6464):660–663.
- [66] Kaiser, E., Colescot, R. L., Bossinge, C. D, & Cook, P. I. (1970) Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* **34**(2):595–ff.
- [67] Kanelis, V., Rotin, D., & Forman-Kay, J. D. (2001) Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex. *Nat Struct Biol* **8**(5):407–412.
- [68] Karanicolas, J. & Brooks, C. L. IIIrd. (2003) The structural basis for biphasic kinetics in the folding of the WW domain from a formin-binding protein: lessons for protein design? *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7):3954–3959.
- [69] Kaul, R., Angeles, A. R., Jäger, M., Powers, E. T., & Kelly, J. W. (2001) Incorporating beta-turns and a turn mimetic out of context in loop 1 of the WW domain affords cooperatively folded beta-sheets. *J Am Chem Soc* **123**(22):5206–5212.
- [70] Kent, S. B. H. (1985) Difficult sequences in stepwise peptide synthesis: Common molecular origins in solution and solid phase? *Peptides: Structure and Function* pages 407–414.
- [71] Kent, S. B. H. (1988) Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem* **57**:957–989.
- [72] Kim, C. W. A. & Berg, J. M. (1993) Thermodynamic beta-sheet propensities measured using a zinc-finger host peptide. *Nature* **362**(6417):267–270.
- [73] Koepf, E. K., Petrassi, H. M., Ratnaswamy, G., Huff, M. E., Sudol, M., & Kelly, J. W. (1999) Characterization of the structure and function of W- ζ FWW domain variants: Identification of a natively unfolded protein that folds upon ligand binding. *Biochemistry* **38**(43):14338–14351.

- [74] Koepf, E. K., Petrassi, H. M., Sudol, M., & Kelly, J. W. (1999) WW: An isolated three-stranded antiparallel beta-sheet domain that unfolds and refolds reversibly; evidence for a structured hydrophobic cluster in urea and GdnHCl and a disordered thermal unfolded state. *Protein Sci* **8**(4):841–853.
- [75] Kortemme, T., Ramirez-Alvarado, M., & Serrano, L. (1998) Design of a 20-amino acid, three-stranded beta-sheet protein. *Science* **281**(5374):253–256.
- [76] Krittanaï, C. & Johnson, W. C. (1997) Correcting the circular dichroism spectra of peptides for contributions of absorbing side chains. *Anal Biochem* **253**(1):57–64.
- [77] Kubelka, J., Hofrichter, J., & Eaton, W. A. (2004) The protein folding 'speed limit'. *Curr Opin Struct Biol* **14**(1):76–88.
- [78] Lacroix, E., Kortemme, T., de la Paz, M. L., & Serrano, L. (1999) The design of linear peptides that fold as monomeric beta-sheet structures. *Curr Opin Struct Biol* **9**(4):487–493.
- [79] Larsen, B. D. & Holm, A. (1994) Incomplete Fmoc deprotection in solid-phase synthesis of peptides. *Int J Pept Protein Res* **43**(1):1–9.
- [80] Letunic, I., Copley, R. R., Schmidt, S., Ciccarelli, F. D., Doerks, T., Schultz, J., Ponting, C. P., & P, P. Bork. (2004) SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue):D142–D144.
- [81] Levy, E., Carman, M. D., Fernandez-Madrid, I. J., Power, M. D., Lieberburg, I., van Duinen, S. G., Bots, G. T., Luyendijk, W., & Frangione, B. (1990) Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* **248**(4959):1124–1126.
- [82] Lu, P. J., Wulf, G., Zhou, X. Z., Davies, P., & Lu, K. P. (1999) The prolyl isomerase pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* **399**(6738):784–788.
- [83] Macias, M. J., Gervais, V., Civera, C., & Oschkinat, H. (2000) Structural analysis of WW domains and design of a WW prototype. *Nat Struct Biol* **7**(5):375–379.
- [84] Macias, M. J., Hyvonen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M., & Oschkinat, H. (1996) Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* **382**(6592):646–649.

- [85] Macias, M. J., Wiesner, S., & Sudol, M. (2002) WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS lett* **513**(1):30–37.
- [86] Matouschek, A., Jr, J. T. Kellis, Serrano, L., Bycroft, M., & Fersht, A. R. (1990) Transient folding intermediates characterized by protein engineering. *Nature* **346**(6283):440–445.
- [87] Maynard, A. J. & Searle, M. S. (1997) NMR structural analysis of a beta-hairpin peptide designed for DNA binding. *Chem Commun* **14**:1297–1298.
- [88] Maynard, A. J., Sharman, G. J., & Searle, M. S. (1998) Origin of beta-hairpin stability in solution: Structural and thermodynamic analysis of the folding of model peptide supports hydrophobic stabilization in water. *J Am Chem Soc* **120**(9):1996–2007.
- [89] McFarland, E. D. Cahir & Thomas, M. L. (1995) CD45 protein-tyrosine phosphatase associates with the WW domain-containing protein, CD45AP, through the transmembrane region. *J Biol Chem* **270**(47):28103–28107.
- [90] Merrifield, R. B. (1963) Solid phase peptide synthesis .1. synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **85**(14):2149.
- [91] Milton, R. C. D., Milton, S. C. F., & Adams, P. A. (1990) Prediction of difficult sequences in solid-phase peptide-synthesis. *J Am Chem Soc* **112**(16):6039–6046.
- [92] Minks, C., Huber, R., Moroder, L., & Budisa, N. (1999) Atomic mutations at the single tryptophan residue of human recombinant annexin V: Effects on structure, stability and activity. *Biochemistry* **38**(33):10649–10659.
- [93] Munoz, V. & Serrano, L. (1995) Helix design, prediction and stability. *Curr Opin Biotechnol* **6**(4):382–386.
- [94] Nesloney, C. L. & Kelly, J. W. (1996) Progress towards understanding beta-sheet structure. *Bioorg Med Chem* **4**(6):739–766.
- [95] Nguyen, H., Jager, M., Moretto, A., Gruebele, M., & Kelly, J. W. (2003) Tuning the free-energy landscape of a WW domain by temperature, mutation, and truncation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7):3948–3953.
- [96] Nicolas, E., Pedroso, E., & Giralt, E. (1989) Formation of aspartimide peptides in Asp-Gly sequences. *Tetrahedron Lett* **30**(4):497–500.

- [97] Otte, L., Wiedemann, U., Schlegel, B., Pires, J. R., Beyermann, M., Schmieder, P., Krause, G., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J., & Oschkinat, H. (2003) WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensities of 42 WW domains. *Protein Sci* **12**(3):491–500.
- [98] Parthasarathy, R., Chaturvedi, S., & Go, K. (1995) Design of alpha-helical peptides: Their role in protein folding and molecular biology. *Prog Biophys Mol Biol* **64**(1):1–54.
- [99] Passani, L. A., Bedford, M. T., Faber, P. W., McGinnis, K. M., Sharp, A. H., Gusella, J. F., Vonsattel, J. P., & MacDonald, M. E. (2000) Huntingtin's WW domain partners in Huntington's disease post-mortem brain fulfill genetic criteria for direct involvement in Huntington's disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* **9**(14):2175–2182.
- [100] Perutz, M. F. (1999) Glutamine repeats and neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Trends Biochem Sci* **24**(2):58–63.
- [101] Perutz, M. F., Johnson, T., Suzuki, M., & Finch, J. T. (1994) Glutamine repeats as polar zippers - their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(12):5355–5358.
- [102] Pires, J. R., Taha-Nejad, F., Toepert, F., Ast, T., Hoffmuller, U., Schneider-Mergener, J., Kuhne, R., Macias, M. J., & Oschkinat, H. (2001) Solution structures of the YAP65 WW domain and the variant L30K in complex with the peptides GTPPPPYTVG, N-(n-octyl)-GPPPY and PLPPY and the application of peptide libraries reveal a minimal binding epitope. *J Mol Biol* **314**(5):1147–1156.
- [103] Quibell, M. & Johnson, T. (2000) Difficult Peptides, in *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach* (Hrsg.: Chan, W.C. und White, P.D.), S. 115-136. Oxford University Press, Oxford.
- [104] Quibell, M., Owen, D., Packman, L. C., & Johnson, T. (1994) Suppression of piperidine-mediated side product formation for Asp(OBu(t))-containing peptides by the use of N-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl) (Hmb) backbone amide protection. *J Chem Soc, Chem Commun* (20):2343–2344.
- [105] Quibell, M., Packman, L. C., & Johnson, T. (1995) Synthesis of the 3-repeat region of human tau 2 by the solid-phase assembly of backbone amide-protected segments. *J Am Chem Soc* **117**(47):11656–11668.

- [106] Quibell, M., Turnell, W. G., & Johnson, T. (1995) Improved preparation of beta-amyloid(1-43) - structural insight leading to optimized positioning of N-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl) (Hmb) backbone amide protection. *J Chem Soc, Perkin Transactions 1* (16):2019–2024.
- [107] Ramirez-Alvarado, M., Blanco, F. J., & Serrano, L. (1996) De novo design and structural analysis of a model beta-hairpin peptide system. *Nat Struct Biol* **3**(7):604–612.
- [108] Ramirez-Alvarado, M., Blanco, F. J., & Serrano, L. (2001) Elongation of the BH8 beta-hairpin peptide: Electrostatic interactions in beta-hairpin formation and stability. *Protein Sci* **10**(7):1381–1392.
- [109] Reed, J. & Reed, T. A. (1997) A set of constructed type spectra for the practical estimation of peptide secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem* **254**(1):36–40.
- [110] Renner, C., Alefelder, S., Bae, J. H., Budisa, N., Huber, R., & Moroder, L. (2001) Fluoroprolines as tools for protein design and engineering. *Angew Chem Int Ed* **40**(5):923–925.
- [111] Rentschler, S., Linn, H., Deininger, K., Bedford, M. T., Espanel, X., & Sudol, M. (1999) The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol Chem* **380**(4):431–442.
- [112] Rohl, C. A. & Baldwin, R. L. (1998) Deciphering rules of helix stability in peptides. *Methods Enzymol* **295**:1–26.
- [113] Russo, T., Faraonio, R., Minopoli, G., de Candia, P., Renzis, S. De, & Zambrano, N. (1998) Fe65 and the protein network centered around the cytosolic domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *FEBS Lett* **434**(1-2):1–7.
- [114] Ruvo, M., Marasco, D., Saporito, A., Perretta, G., Palladino, P., Rossi, F., Benedetti, E., & Pedone, C. (2003) Improved Fmoc SPPS by chain protonation and in situ neutralization. *Biopolymers* **71**(3):343–343.
- [115] Sampson, W. R., Patsiouras, H., & Ede, N. J. (1999) The synthesis of 'difficult' peptides using 2-hydroxy-4-methoxybenzyl or pseudoproline amino acid building blocks: a comparative study. *J Pept Sci* **5**(9):403–409.

- [116] Santiveri, C. M., Rico, M., & Jimenez, M. A. (2000) Position effect of cross-strand side-chain interactions on beta-hairpin formation. *Protein Sci* **9**(11):2151–2160.
- [117] Santiveri, C. M., Rico, M., Jimenez, M. A., Pastor, M. T., & Perez-Paya, E. (2003) Insights into the determinants of beta-sheet stability: ¹H and ¹³C NMR conformational investigation of three-stranded antiparallel beta-sheet-forming peptides. *J Pept Res* **61**(4):177–188.
- [118] Santiveri, C. M., Santoro, J., Rico, M., & Jimenez, M. A. (2004) Factors involved in the stability of isolated beta-sheets: Turn sequence, beta-sheet twisting, and hydrophobic surface burial. *Protein Sci* **13**(4):1134–1147.
- [119] Santoro, M. M. & Bolen, D. W. (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**(21):8063–8068.
- [120] Schenck, H. L. & Gellman, S. H. (1998) Use of a designed triple-stranded antiparallel beta-sheet to probe beta-sheet cooperativity in aqueous solution. *J Am Chem Soc* **120**(19):4869–4870.
- [121] Schild, L., Lu, Y., Gautschi, I., Schneeberger, E., Lifton, R. P., & Rossier, B. C. (1996) Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *EMBO J* **15**(10):2381–2387.
- [122] Schnölzer, M., Alewood, P., Jones, A., Alewood, D., & Kent, S. B. H. (1992) In-situ neutralization in Boc-chemistry solid-phase peptide-synthesis - rapid, high-yield assembly of difficult sequences. *Int J Pept Protein Res* **40**(3-4):180–193.
- [123] Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., & Ponting, C. P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11):5857–5864.
- [124] Searle, M. S. (2001) Peptide models of protein beta-sheets: design, folding and insights into stabilising weak interactions. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* (7):1011–1020.
- [125] Searle, M. S., Zerella, R., Dudley, D. H., & Packman, L. C. (1996) Native-like beta-hairpin structure in an isolated fragment from ferredoxin: NMR and CD studies of solvent effects on the N-terminal 20 residues. *Protein engineering* **9**(7):559–565.

- [126] Sharman, G. J. & Searle, M. S. (1997) Dissecting the effects of cooperativity on the stabilisation of a de novo designed three stranded anti-parallel beta-sheet. *Chem Commun* (20):1955–1956.
- [127] Smith, C. K. & Regan, L. (1995) Guidelines for protein design - the energetics of beta-sheet side-chain interactions. *Science* **270**(5238):980–982.
- [128] Smith, C. K., Withka, J. M., & Regan, L. (1994) A thermodynamic scale for the beta-sheet forming tendencies of the amino acids. *Biochemistry* **33**(18):5510–5517.
- [129] Sohma, Y., Sasaki, M., Hayashi, Y., Kimura, T., & Kiso, Y. (2004) Design and synthesis of a novel water-soluble A beta 1-42 isopeptide: an efficient strategy for the preparation of Alzheimer's disease-related peptide, A beta 1-42, via O-N intramolecular acyl migration reaction. *Tetrahedron Lett* **45**(31):5965–5968.
- [130] Sohma, Y., Sasaki, M., Hayashi, Y., Kimura, T., & Kiso, Y. (2004) Novel and efficient synthesis of difficult sequence-containing peptides through O-N intramolecular acyl migration reaction of O-acyl E isopeptides. *Chem Commun* (1):124–125.
- [131] Stanger, H. E. & Gellman, S. H. (1998) Rules for antiparallel beta-sheet design: D-Pro-Gly is superior to L-Asn-Gly for beta-hairpin nucleation. *J Am Chem Soc* **120**(17):4236–4237.
- [132] Stanger, H. E., Syud, F. A., Espinosa, J. F., Giriatt, I., Muir, T., & Gellman, S. H. (2001) Length-dependent stability and strand length limits in antiparallel beta-sheet secondary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(21):12015–12020.
- [133] Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J., & Rotin, D. (1996) WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial na+ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J* **15**(10):2371–2380.
- [134] Street, A. G. & Mayo, S. L. (1999) Intrinsic beta-sheet propensities result from van der waals interactions between side chains and the local backbone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16):9074–9076.
- [135] Sudol, M. (1998) From src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'. *Oncogene* **17**(11 Reviews):1469–1474.
- [136] Sudol, M., Bork, P., Einbond, A., Kastury, K., Druck, T., Negrini, M., Huebner, K., & Lehman, D. (1995) Characterization of the mammalian YAP (yes-associated protein)

- gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *J Biol Chem* **270**(24):14733–14741.
- [137] Sudol, M. & Hunter, T. (2000) NeW wrinkles for an old domain. *Cell* **103**(7):1001–1004.
- [138] Swint, L. & Robertson, A. D. (1993) Thermodynamics of unfolding for turkey ovomucoid third domain: thermal and chemical denaturation. *Protein Sci* **2**(12):2037–2049.
- [139] Syud, F. A., Stanger, H. E., & Gellman, S. H. (2001) Interstrand side chain–side chain interactions in a designed beta-hairpin: significance of both lateral and diagonal pairings. *J Am Chem Soc* **123**(36):8667–8677.
- [140] Syud, F. A., Stanger, H. E., Mortell, H. S., Espinosa, J. F., Fisk, J. D., Fry, C. G., & Gellman, S. H. (2003) Influence of strand number on antiparallel beta-sheet stability in designed three- and four-stranded beta-sheets. *J Mol Biol* **326**(2):553–568.
- [141] Takahashi, Y., Ueno, A., & Mihara, H. (2000) Mutational analysis of designed peptides that undergo structural transition from alpha helix to beta sheet and amyloid fibril formation. *Structure Fold Des* **8**(9):915–925.
- [142] Tam, J. P. (1985) Enhancement of coupling efficiency in solid phase peptide synthesis by elevated temperature. *Peptides: Structure and Function* pages 423–425.
- [143] Tam, J. P. & Lu, Y. A. (1995) Coupling difficulty associated with interchain clustering and phase-transition in solid-phase peptide-synthesis. *J Am Chem Soc* **117**(49):12058–12063.
- [144] Tang, Y., Ghirlanda, G., Vaidehi, N., Kua, J., Mainz, D. T., III, W. A. Goddard, DeGrado, W. F., & Tirrell, D. A. (2001) Stabilization of coiled-coil peptide domains by introduction of trifluoroleucine. *Biochemistry* **40**(9):2790–2796.
- [145] Tatko, C. D. & Waters, M. L. (2002) Selective aromatic interactions in beta-hairpin peptides. *J Am Chem Soc* **124**(32):9372–9373.
- [146] Tatko, C. D. & Waters, M. L. (2003) The geometry and efficacy of cation-pi interactions in a diagonal position of a designed beta-hairpin. *Protein Sci* **12**(11):2443–2452.
- [147] Tatko, C. D. & Waters, M. L. (2004) Comparison of c-h...pi and hydrophobic interactions in a beta-hairpin peptide: impact on stability and specificity. *J Am Chem Soc* **126**(7):2028–2034.

- [148] Thaler, A., Seebach, D., & Cardinaux, F. (1991) Lithium-salt effects in peptide-synthesis .2. improvement of degree of resin swelling and of efficiency of coupling in solid-phase synthesis. *Helvetica Chimica Acta* **74**(3):628–643.
- [149] Torrent, J., Rubens, P., Ribo, M., Heremans, K., & Vilanova, M. (2001) Pressure versus temperature unfolding of ribonuclease A: an FTIR spectroscopic characterization of 10 variants at the carboxy-terminal site. *Prot Sci* **10**(4):725–734.
- [150] Wiesner, S., Stier, G., Sattler, M., & Macias, M. J. (2002) Solution structure and ligand recognition of the WW domain pair of the yeast splicing factor prp40. *J Mol Biol* **324**(4):807–822.
- [151] Wisniewski, T., Ghiso, J., & Frangione, B. (1991) Peptides homologous to the amyloid protein of Alzheimer's disease containing a glutamine for glutamic acid substitution have accelerated amyloid fibril formation. *Biochem Biophys Res Commun* **179**(3):1247–1254.
- [152] Wöhr, T. & Mutter, M. (1995) Pseudo-prolines in peptide-synthesis - direct insertion of serine and threonine derived oxazolidines in dipeptides. *Tetrahedron Lett* **36**(22):3847–3848.
- [153] Wong, C. Y. & Eftink, M. R. (1998) Incorporation of tryptophan analogues into staphylococcal nuclease: stability toward thermal and guanidine-HCl induced unfolding. *Biochemistry* **37**(25):8947–8953.
- [154] Yoder, N. C. & Kumar, K. (2002) Fluorinated amino acids in protein design and engineering. *Chem Soc Rev* **31**(6):335–341.
- [155] Zarrinpar, A. & Lim, W. A. (2000) Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition. *Nat Struct Biol* **7**(8):611–613.
- [156] Zscherp, C., Aygun, H., Engels, J. W., & Mantele, W. (2003) Effect of proline to alanine mutation on the thermal stability of the all-beta-sheet protein tendamistat. *Biochim Biophys Acta* **1651**(1-2):139–145.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. K. Neubert danke ich für seine Bereitschaft die Arbeit von Seiten der Martin-Luther Universität zu Halle-Wittenberg zu betreuen.

Herrn Prof. M. Bienert danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die jederzeit gewährte Unterstützung und seine Diskussionsbereitschaft.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. H. Oschkinat und Herrn Dr. M. Beyermann für ihr ständiges Interesse am Voranschreiten der Arbeit, sowie für ihren fachlichen Rat und die vielen hilfreichen Diskussionen bedanken.

Daneben gilt mein aufrichtiger Dank Herrn Prof. Sir A. Fersht (Centre for Protein Engineering (CPE) Cambridge, UK) für die Möglichkeit Faltungsexperimente in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Ein ganz besonderer Dank geht dabei an Herrn Dr. N. Ferguson für den herzlichen Empfang in Cambridge, die exzellente Betreuung und die vielen motivierenden Worte.

Den Herren H. Holtmann und M. Fossi danke ich für die mühevollen NMR-Messungen und Strukturberechnungen sowie Herrn H. Strauss für die Durchführung der Analytischen Ultrazentrifugation. Bei Herrn Dr. Fabian (Robert Koch Institut, Berlin) bedanke ich mich für die Einarbeitung in die FT-IR-Spektroskopie und die weitere Unterstützung bei den Messungen. Mein Dank gilt ebenfalls der Abteilung Massenspektrometrie unter der Leitung von Dr. E. Krause und darunter besonders Frau H. Lerch, die mit fast übermenschlichem Einsatz die unmöglichsten Proben in wertvolle Massenspektren verwandelt hat. Ein großes Dankeschön möchte ich Frau A. Klose, Frau A. Ehrlich, Frau D. Krause, Frau H. Nikolenko und Herrn B. Schmikale für die technische Unterstützung und viele gute Ratschläge aussprechen.

Vielen Dank auch allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Peptidchemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders den Doktoranden und Ehemaligen danke ich herzlich für den Spaß auch außerhalb des Instituts.

Nicht zuletzt vielen Dank an meine Eltern für ihre unermüdliche Unterstützung sowie ihren unabhängigen Rat bei der Anfertigung dieser Arbeit und an André für seinen unerschütterlichen Optimismus.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet.

Weder diese noch eine andere wissenschaftliche Arbeit wurde von mir zuvor an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg oder einer anderen Hochschule zum Zwecke der Einleitung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Angaben zur Person und zum Bildungsweg

Sandra Tremmel, geb. am 29.08.1975 in Mannheim-Neckarau

Sep 1986 - Jun 1995	Moll-Gymnasium Mannheim, Abitur
Okt 1995 - Feb 1997	Studium der Biotechnologie bis zum Vordiplom an der Fachhochschule Bingen
Mrz 1997 - Mai 2000	Fortsetzung des Studium der Biotechnologie an der Fachhochschule Mannheim, Hochschule für Technik und Gestaltung
Mrz 1998 - Aug 1998	Praxissemester bei SangStat Medical Corp. Fremont, CA (USA) zum Thema "Investigation into the causes of lupus associated affinity on the PRA-STAT ELISA"
Okt 1999 - Mai 2000	Abschluß des Studiums mit der Diplomarbeit "Untersuchungen zur Prozeßstabilität von Formiatdehydrogenasen" bei der Firma Degussa-Hüls AG, Hanau
Mai 2000 - Jul 2000	Projektmitarbeit im Transferzentrum für Technische Beratung der Steinbeis GmbH & Co and der Fachhochschule Mannheim, Hochschule für Technik und Gestaltung
Aug 2000 - Jun 2001	Tätigkeit als Quality Metrics Specialist bei der Firma Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Jul 2001 - Jun 2005	Doktorandin in der Abteilung Peptidchemie des Forschungsinstituts für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin Anfertigung einer Dissertation zum Thema "Design, Synthese und Stabilität von β -Faltblatt Modellpeptiden"