

**Entwicklung eines *coiled coil*-basierten Screeningsystems
zur Bestimmung spezifischer Wechselwirkungspartner
fluoralkylsubstituierter Aminosäuren**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker Toni Vagt
aus Leipzig, Deutschland

Mai 2009

1. Gutachterin: Prof. Dr. Beate Korsch
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Saenger

Disputation am: 17.07.2009

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Beate Kokschi in der Zeit von Juni 2004 bis Mai 2009 am Institut für Chemie und Biochemie des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Hiermit versichere ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Entwicklung eines *coiled coil*-basierten Screeningsystems zur Bestimmung spezifischer Wechselwirkungspartner fluoralkylsubstituierter Aminosäuren“ selbstständig und ohne Benutzung anderer als der zugelassenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Alle aufgeführten Zitate sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt.

Berlin, Mai 2009

Toni Vagt

Aus dieser Dissertation gingen bisher folgende Veröffentlichungen hervor:

- T. Vagt, C. Jäckel, S. Samsonov, M.T. Pisabarro, B. Kokschi. Selection of a buried salt bridge by phage display, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 3924-3927.
- M. Salwiczek, S. Samsonov, T. Vagt, C. Baldauf, E. Nyakatura, E. Fleige, J. Numata, H. Cölfen, M. T. Pisabarro, and B. Kokschi. Position dependent effects of fluorinated amino acids on hydrophobic core formation of a coiled coil heterodimer, *Chem. Eur. J.* **2009**, *angenommen*, doi:10.1002/chem.200802136.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Beate Koksch danke ich für das interessante und abwechslungsreiche Thema sowie die Betreuung der Arbeit und die gewährte wissenschaftliche Freiheit. Der Arbeitsgruppe danke ich für das stets angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfram Saenger für die Übernahme der Begutachtung meiner Dissertation bedanken. Darüberhinaus danke ich Prof. Saenger und seiner Arbeitsgruppe sehr für die Bereitstellung der ausgezeichneten Arbeitsbedingungen für die molekularbiologischen Arbeiten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Christian Jäckel für die Einführung in die molekularbiologischen Arbeiten und das Phage Display, sein Interesse am Gelingen und Fortgang dieser Arbeit sowie zahlreiche konstruktive Diskussionen zu diesem Thema.

Mein spezieller Dank gilt Herrn Dipl.-Chem. Mario Salwiczek und Herrn Dipl.-Biochem. Matthias Hakelberg für die freundschaftliche Zusammenarbeit auf diesem Forschungsprojekt sowie für die Korrektur des Manuskripts dieser Arbeit.

Frau Antje Völkel danke ich für die umfangreiche Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Ultrazentrifugationsexperimente und die dabei von ihr aufgebrachte Geduld.

Mein Dank gilt des weiteren Herrn Dipl.-Chem. Sergey Samsonov für die durchgeführten Moleküldynamiksimulationen.

Frau Dipl.-Chem. Jessica Falenski, Frau M.Sc. Raheleh Rezaei Araghi und Herrn M.Sc. Morhaf Abu Ammar danke ich für die Aufnahme zahlreicher Massenspektren.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und Silvia für den Rückhalt und das Verständnis sowie die materielle Unterstützung während meines Studiums und der Promotion.

Referat

Fluorierte Aminosäuren stellen wertvolle Bausteine für die Konstruktion neuartiger Peptid- und Proteinstrukturen dar. Die einzigartigen Eigenschaften des Fluoratoms sowie das Fehlen dieses Elements im Pool der kanonischen Aminosäuren erlauben eine Vielzahl interessanter Anwendungen dieser Moleküle. Die häufig beobachtete Erhöhung der Proteasestabilität von Peptiden infolge des Einbaus fluorierter Aminosäuren sowie die höhere Hydrophobie und der damit verbundene Anstieg der Membranpermeabilität machen diese Verbindungen zu attraktiven Bausteinen für die Entwicklung pharmazeutischer Wirkstoffe. Allerdings sind die Möglichkeiten des gezielten Einsatzes fluorierter Aminosäuren für das Design peptidbasierter Wirkstoffe aufgrund der nach wie vor lückenhaften Kenntnisse bezüglich ihrer biologischen Eigenschaften stark eingeschränkt. Besonders die Wechselwirkungsmöglichkeiten mit natürlichen Aminosäuren in einer nativen Proteinumgebung sind bisher nur wenig untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein paralleles *coiled coil*-Heterodimer entworfen, welches die Untersuchung des Wechselwirkungsverhaltens fluorierter Aminosäuren innerhalb einer natürlichen Proteinumgebung erlaubt. Ausgehend von diesem Peptidmodell wurde ein Phage Display-basiertes Screeningsystem entwickelt, um die bevorzugten Wechselwirkungspartner fluorierter Aminosäuren zu bestimmen und detaillierte Informationen über die Interaktionsmöglichkeiten dieser Reste zu erhalten. Hierfür wurden die zu untersuchenden nicht-natürlichen Aminosäuren in einen Peptidstrang (Screeningpeptid) des Modellsystems eingebaut, während im gegenüberliegenden Peptidstrang (Bibliothekspeptid) die direkt mit der substituierten Aminosäure wechselwirkenden Aminosäurepositionen randomisiert wurden. Nachdem die Bindung zwischen dem Screeningpeptid und dem auf der Phagenoberfläche präsentierten Bibliothekspeptid gezeigt werden konnte, wurden auf Grundlage der *coiled coil*-Wechselwirkung aus der Bibliothek die besten Bindungspartner für das Screeningpeptid isoliert. Das entwickelte Verfahren wurde an verschiedenen kanonischen Aminosäuren erfolgreich getestet und schließlich für die Bestimmung bevorzugter Wechselwirkungspartner fluorierter Aminosäuren angewendet. Untersucht wurden dabei die bereits zuvor in der Arbeitsgruppe von Prof. Koksch verwendeten Aminosäuren Difluorethylglycin, Difluorpropylglycin und Trifluorethylglycin. Obwohl diese Aminosäuren deutliche Unterschiede in Raumanpruch und Polarität aufweisen, konnte gezeigt werden, dass diese in den untersuchten Substitutionspositionen die gleichen Wechselwirkungspartner bevorzugen wie die natürlichen hydrophoben Aminosäuren Leucin bzw. Valin.

Abstract

Fluorinated amino acids represent useful building blocks for the construction of novel peptide and protein structures. The unique properties of fluorine and its absence from the pool of canonical amino acids offer a wide range of applications. Due to the observation that fluorinated amino acids often enhance the proteolytic stability as well as the hydrophobicity and membrane permeability of peptides, these building blocks are interesting tools for drug design. However, the directed application of fluorinated amino acids in the development of peptide based drugs is limited by the narrow knowledge of the biological properties of fluorinated building blocks. Particularly, the interactions with natural amino acids within a native protein environment are poorly investigated.

In this thesis a parallel coiled coil heterodimer was designed, which enables the investigation of the interaction properties of fluorinated amino acids within a native protein environment. Based on this model a phage display based screening system was developed to determine preferred interaction partners of fluorinated amino acids and to achieve detailed information of possible interactions of these residues. Accordingly, the non canonical amino acids were incorporated at a central **a**- or **d**-position of one of both peptide strands (screening peptide) while in the opposite peptide (library peptide) the positions which directly interact with the substituted amino acids were randomized. Binding between screening peptide and the library peptide displayed on the surface of bacteriophage M13 was shown and a peptide library of sufficient size was constructed. Based on the coiled coil interaction the best binding partners for the screening peptide were selected out of the pool of potential interaction partners. First, the selection strategy was tested and optimized using the unsubstituted screening peptide. The sensitivity of the selection procedure was successfully tested using different canonical amino acids and the procedure was applied to the selection of preferred interaction partners of fluorinated amino acids. Thereby, difluoroethylglycine, difluoropropylglycine and trifluoroglycine, which were used in the group of Professor Koksche before, were investigated. However, even though significant differences in steric demand and polarity were shown for these amino acids before, no differences regarding preferred interaction partners were observed. Incorporated within the hydrophobic core of a α -helical coiled coil, the fluorinated amino acids investigated in this thesis prefer the same binding partners as native hydrophobic amino acids such as leucine and valine which naturally occur in these positions.

Abkürzungen

Abz	o-Aminobenzoessäure
ACN	Acetonitril
Äq	Äquivalent
ATP	Adenosintriphosphat
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
Boc	Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Zirkulardichroismus
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
DfeGly	(S)-4,4-Difluorethylglycin [(S)-2-Amino-4,4-difluorbutansäure]
DfpGly	(S)-4,4-Difluorpropylglycin [(S)-2-Amino-4,4-difluorpentansäure]
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDT	1,2-Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LB	Luria Broth
MD	Moleküldynamik
MS	Massenspektrometrie
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz
OD	optische Dichte

Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronenemissionstomographie
pfu	<i>plaque forming unit</i>
RT	Raumtemperatur
SB	Super Broth
selekt.	selektiert
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylamintetrafluoroborat
<i>t</i>Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCTU	2-(6-Chloro-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylamintetrafluoroborat
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TFA	Trifluoressigsäure
TfeGly	(<i>S</i>)-4,4,4-Trifluorethylglycin [(<i>S</i>)-2-Amino-4,4,4-trifluorbutansäure]
TIS	Triisopropylsilan
Trt	Trityl
U	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett
ü.N	über Nacht
Xaa	Aminosäure allgemein

Die Drei- und Einbuchstabencodes der Aminosäuren wurden nach den Empfehlungen der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur verwendet (*Eur. J. Biochem.* **1984**, 138, 9-37).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Fluor in biologisch aktiven Verbindungen	3
2.1	Die Eigenschaften organisch gebundenen Fluors	3
2.1.1	Größe und sterische Effekte fluorierter Alkylgruppen	4
2.1.2	Wasserstoffbrückenbindungen und polare Wechselwirkungen	6
2.1.3	Hydrophobie, Lipophilie und der „Fluoreffekt“	8
2.2	Fluorierte Verbindungen biologischen Ursprungs	9
2.3	Fluorierte Aminosäuren in Peptiden und Proteinen	10
2.3.1	Der Einbau fluorierter Aminosäuren in Peptide und Proteine	11
2.3.2	Fluorierte Aminosäuren für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen	13
2.3.3	Fluorierte Aminosäuren in biologisch aktiven Peptiden	15
2.3.4	Modifizierung und Stabilisierung von Proteinstrukturen durch den Einbau fluorierter Aminosäuren	16
2.3.4.1	Fluorprolin	17
2.3.4.2	Fluorierte Aminosäuren in hydrophoben Peptidregionen	19
3	Zielstellung	24
4	Konzept	25
4.1	Die Herstellung und das Screening von Peptidbibliotheken	25
4.1.1	Der Bakteriophage M13	26
4.1.1.1	Struktur und Genom des Bakteriophagen M13	27
4.1.1.2	Lebenszyklus des Bakteriophagen M13	29
4.1.2	Präsentation von Peptiden und Proteinen an der Oberfläche von M13	31
4.1.2.1	<i>Phagemid</i> -Display am Hüllprotein pIII	33
4.2	Das <i>coiled coil</i>-Faltungsmotiv als Modellsystem	33
4.2.1	Struktur und Designprinzipien des α -helikalen <i>coiled coil</i>	34
4.3	Das <i>coiled coil</i>-basierte Screeningsystem	36

5	Ergebnisse und Diskussion	38
5.1	Entwicklung des <i>coiled coil</i>-basierten Screeningsystems	38
5.1.1	<i>Coiled coil</i> -Design	38
5.1.2	Überprüfung des Designs	39
5.1.3	Test der Selektionsstrategie	43
5.1.3.1	Herstellung rekombinanter Phagen	44
5.1.3.2	Selektion	45
5.2	Substitution in Position a₁₆	46
5.2.1	Konstruktion der Bibliothek VPE _{Bibo-a16}	47
5.2.2	Test und Optimierung der Selektionsstrategie	50
5.2.3	Selektion bevorzugter Wechselwirkungspartner für Asparagin in Position a ₁₆	53
5.2.4	Die Selektion bevorzugter Wechselwirkungspartner für DfeGly, DfpGly und TfeGly in Position a ₁₆	56
5.3	Substitution in Position d₁₉	62
5.3.1	Konstruktion der Bibliothek VPE _{Bibo-d19}	63
5.3.2	Selektion gegen VPK	65
5.3.3	Selektion bevorzugter Wechselwirkungspartner für Glutaminsäure in Position d ₁₉	66
5.3.4	Die Selektion bevorzugter Wechselwirkungspartner für DfeGly, DfpGly und TfeGly in Position d ₁₉	72
6	Zusammenfassung und Ausblick	80
7	Experimentelle Beschreibung	84
7.1	Peptidchemie	84
7.1.1	Allgemeine Angaben	84
7.1.2	Peptidsynthese	86
7.1.2.1	Automatisierte Festphasensynthese	87
7.1.2.2	Manuelle Aminosäurekupplung	88
7.1.3	Analyse und Reinigung	90
7.1.4	Synthetisierte Peptide	90
7.2	Faltungsstudien	95
7.2.1	Allgemeine Bedingungen	95
7.2.2	Konzentrationsbestimmung	95

7.2.3	CD-Spektroskopie	96
7.2.4	Fluoreszenzspektroskopie	97
7.2.5	Analytische Ultrazentrifugation	98
7.3	Molekularbiologie und Phage Display	99
7.3.1	Puffer und Medien	100
7.3.2	DNA-Präparation und DNA-Reinigung	102
7.3.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	102
7.3.2.2	DNA-Fällung	102
7.3.2.3	Plasmidpräparation	103
7.3.3	Herstellung elektrokompetenter Zellen	103
7.3.3.1	Protokoll 1: Herstellung von 55 µl Aliquoten	104
7.3.3.2	Protokoll 2: Herstellung von 300 µl Aliquoten	104
7.3.3.3	Kompetenztest	105
7.3.4	PCR-Kolonie-Scan und DNA-Sequenzierung	105
7.3.5	Herstellung der Helferphagen	107
7.3.6	Molekulare Klonierung und Herstellung der Phagenbibliothek	107
7.3.6.1	Ligation und Transformation der Bibliothek	109
7.3.6.2	Ligation und Transformation nicht randomisierter DNA	111
7.3.7	Produktion rekombinanter Phagen	112
7.3.8	<i>Panning</i>	112
8	Literatur	115

1 Einleitung

Peptide spielen eine zentrale Rolle in allen biologischen Systemen und nehmen beispielsweise als Hormone, Neurotransmitter oder Cytokine aktiv an der Kontrolle einer Vielzahl von Lebensfunktionen teil. Ihre hohe strukturelle Diversität und die damit verbundene Spezifität bei der Ausbildung molekularer Wechselwirkungen sowie ihre herausragende Rolle bei der Regulation lebensnotwendiger Prozesse rücken Peptide zunehmend in den Blickpunkt der pharmazeutischen Forschung.^{1,2} So finden gegenwärtig ca. 140 verschiedene Peptide klinische Anwendung und schätzungsweise 400 weitere peptidbasierte Wirkstoffe befinden sich in der vorklinischen Prüfung.³ Dienten Peptide früher in erster Linie als Peptidimpfstoffe gegen virale Infektionen oder fanden Einsatz als Peptidhormone zur Behandlung von Stoffwechselkrankheiten, etablieren sie sich zunehmend als wirkungsvolle Waffen gegen eine Vielzahl anderer ernsthafter Krankheiten wie AIDS, Krebs oder neurodegenerative Erkrankungen.^{4,5}

Peptide zeichnen sich dabei durch eine Reihe positiver Eigenschaften, wie ihrer geringen Größe und einer hohen Aktivität und Spezifität aus. Darüberhinaus zeigen therapeutische Peptide gewöhnlich eine geringe Toxizität und führen nur selten zu Immunreaktionen. Einen weiteren Vorteil stellt die Möglichkeit dar, vergleichsweise einfach spezifisch bindende Peptide für eine Vielzahl unterschiedlicher Zielstrukturen aus umfangreichen Peptidbibliotheken, beispielsweise Phagen- oder Aptamerbibliotheken zu selektieren.⁶

Einer der größten Nachteile peptidbasierter Wirkstoffe liegt zweifellos in ihrer geringen biologischen Verfügbarkeit, da sie in den Nieren und der Leber sehr schnell aus dem Blutkreislauf entfernt werden und nur eine geringe Membranpermeabilität zeigen. Darüberhinaus werden besonders unstrukturierte Peptide rasch von körpereigenen Enzymen abgebaut und ihre Halbwertszeit dadurch zusätzlich verringert. Die Entwicklung effizienter Methoden zur Modifizierung und Stabilisierung von Peptiden bildet daher eine der größten Herausforderungen bei der Entwicklung therapeutisch verwendbarer Wirkstoffe. Neben der strukturellen Nachahmung von Peptiden hat sich hierbei besonders der Einsatz nicht-natürlicher Aminosäuren als geeignete Methode erwiesen um die *in vivo* Stabilität von Peptidwirkstoffen zu erhöhen. So eignen sich beispielsweise β -Aminosäuren oder D-Aminosäuren zur Konstruktion proteasestabiler Strukturen.^{7,8} Obwohl diese Bausteine die gleichen Seitenketten wie natürlich vorkommende L-Aminosäuren aufweisen, werden diese von Proteasen gewöhnlich nicht erkannt. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von Aminosäuren mit modifizierten Seitenketten, welche ebenfalls zur proteolytischen Stabilität beitragen können und darüberhinaus den Vorteil besitzen, durch zusätzliche Seitenkettenfunktionen das Repertoire der natürlichen Aminosäurebausteine zu erweitern.⁹

Eine vielversprechende Modifikation stellt dabei der Einbau organisch gebundenen Fluors in Form fluorierter Aminosäuren dar. Eine Vielzahl fluorierter Verbindungen hat bis heute Einzug in die Entwicklung spezieller Materialien, medizinischer Wirkstoffe und Pflanzenschutzmittel gefunden.^{10,11,12} Die einzigartigen Eigenschaften des Fluors führen dabei in vielen Fällen zu einer deutlichen Erhöhung der biologischen Verfügbarkeit und schaffen neue, einzigartige Wechselwirkungsmöglichkeiten durch die Einführung dieses Heteroatoms. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass bereits der Einbau einzelner fluorierter Aminosäuren einen starken Einfluss auf die Peptidstruktur ausüben kann. Besonders nach dem Einbau mehrerer fluoralkylsubstituierter Aminosäuren kann häufig eine deutliche Stabilisierung der Proteinstruktur in Folge der spezifischen Eigenschaften der nicht-natürlichen Aminosäureseitenketten beobachtet werden.

Trotz zahlreicher Untersuchungen sind der Einfluss fluoralkylierter Seitenketten auf die Wechselwirkungen innerhalb einer natürlichen Proteinumgebung sowie die grundlegenden physikalischen und chemischen Eigenschaften fluorierter Aminosäuren bisher wenig verstanden. Besonders die Fragen nach der Ausbildung von F...H-Brücken, dem sterischen Effekt und dem sog. „Fluoreffekt“ sind bisher nur unzureichend beantwortet. Obwohl für unterschiedliche fluoralkylsubstituierte Aminosäuren der strukturelle Einfluss auf bestimmte Strukturmodule zum Teil intensiv untersucht wurde, ist wenig über die Ursachen der beobachteten Veränderungen in der Stabilität der einzelnen Struktureinheiten bekannt. Darüberhinaus sind Informationen über das spezifische Wechselwirkungsverhalten fluorierter Aminosäuren mit natürlichen Aminosäuren von großem Interesse für die Entwicklung spezifisch bindender Peptide und Proteine. Die systematische Untersuchung dieser Wechselwirkungen ist somit Voraussetzung für den gezielten Einsatz fluoralkylsubstituierter Aminosäuren im Peptid- und Proteindesign.

2 Fluor in biologisch aktiven Verbindungen

Fluor stellt eines der häufigsten Elemente der Erdkruste dar. Dennoch sind bis heute nur wenige organische Fluorverbindungen biologischen Ursprungs bekannt.^{13,14} Die Hauptursachen hierfür liegen vermutlich in der sehr geringen biologischen Verfügbarkeit des Fluors (ca. 1,3 ppm im Meerwasser), sowie dessen geringer Nukleophilie in wässriger Lösung. Aufgrund der spezifischen Eigenschaften des Fluoratoms und der Fluor-Kohlenstoff-Bindung hat die Einführung eines oder mehrerer Fluoratome häufig eine starke Veränderung der chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften chemischer Verbindungen zur Folge. Entsprechend vielfältig sind die Einsatzmöglichkeiten fluorierter Moleküle auf medizinischer und technischer Ebene. So verwundert es nicht, dass es sich bei schätzungsweise 20 % der gegenwärtig entwickelten Pharmazeutika sowie ca. einem Viertel aller Pflanzenschutzmittel um fluorierte Verbindungen handelt.^{15,16,17}

Bedingt durch die geringe Größe des Fluoratoms werden biologisch aktive Verbindungen durch die Einführung einzelner Fluoratome in ihrer Funktion gewöhnlich kaum beeinträchtigt und weiterhin von ihren natürlichen Wechselwirkungspartnern erkannt. Gleichzeitig ermöglichen die einzigartigen Eigenschaften des Fluoratoms die gezielte Beeinflussung dieser Wechselwirkungen sowie die Untersuchung der daran beteiligten Prozesse mit Hilfe unterschiedlicher spektroskopischer Methoden wie ¹⁹F-NMR, ¹⁸F-PET und Ramanspektroskopie.^{18,19,20} Darüberhinaus führt die Fluorierung durch eine Steigerung der Hydrophobie und der metabolischen Stabilität häufig zur Erhöhung der biologischen Verfügbarkeit entsprechend substituierter Moleküle und bietet sich nicht zuletzt dadurch für die Modifizierung pharmakologisch relevanter Verbindungen an.²¹

2.1 Die Eigenschaften organisch gebundenen Fluors

Die Möglichkeit, durch Fluorierung die pharmakologischen Eigenschaften biologisch aktiver Verbindungen zu beeinflussen, erklärt den hohen Anteil fluorierter Moleküle im Bereich der Pflanzenschutzmittel und medizinischen Wirkstoffe. Bedingt durch die hohe Ionisierbarkeit sowie die geringe Polarisierbarkeit des Fluoratoms (Tabelle 2.1) zeigen (per)fluorierte Verbindungen gewöhnlich nur geringe intermolekulare Wechselwirkungen. Die hohe Elektronegativität des Fluors, sowie seine geringe Größe und die starke Überlappung des 2s und 2p Orbitals mit den korrespondierenden Orbitalen des Kohlenstoffs führen zu einem starken elektronenziehenden Effekt kohlenstoffgebundener Fluorsubstituenten. Darüberhinaus zeigt die C-F-Bindung einen starken ionischen

Charakter und weist eine höhere Bindungsenergie auf als die Bindung zwischen Kohlenstoff und anderen Halogenen.

Prinzipiell unterscheiden sich in einzelnen Positionen fluorierte Moleküle in ihren Eigenschaften deutlich von hochsubstituierten perfluorierten Verbindungen. Während sich letztere in den physikalischen Eigenschaften mitunter erheblich von ihren nicht fluorierten Analoga unterscheiden, zeigen gering fluorierte Moleküle in erster Linie veränderte chemische Eigenschaften und nur geringe Änderungen ihrer physikalischen Eigenschaften.²²

Tabelle 2.1. Eigenschaften des Fluors im Vergleich zu anderen Elementen.²²

Atom	Ionisations-Potential (kcal/mol)	Elektronen-affinität (kcal/mol)	Polarisier-barkeit (Å ³)	van der Waals-Radius (Å)	Elektro-negativität (χ _p)
H	313,6	17,7	0,667	1,20	2,20
F	401,8	79,5	0,557	1,47	3,98
Cl	299,0	83,3	2,18	1,75	3,16
Br	272,4	72,6	3,05	1,85	2,96
I	241,2	70,6	4,7	1,98	2,66
C	240,5	29,0	1,76	1,70	2,55
N	335,1	-6,2	1,10	1,55	3,04
O	314,0	33,8	0,82	1,52	3,44

Die Substitution einzelner Wasserstoffatome oder Hydroxylgruppen durch Fluoratome stellt eine der verbreitetsten Strategien zur Modifizierung der biologischen Eigenschaften pharmakologischer Wirkstoffe dar. Während dabei, zumindest im Fall einfach fluorierte Verbindungen, die sterischen Verhältnisse kaum beeinflusst werden, verändert die Einführung des elektronegativen Fluoratoms die elektronischen Eigenschaften deutlich. Diese Änderungen haben ihrerseits z.T. erheblichen Einfluss auf die biologischen Eigenschaften der betroffenen Moleküle und sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

2.1.1 Größe und sterische Effekte fluorierte Alkylgruppen

Obwohl sich Fluor und Wasserstoff in ihrer Größe deutlich unterscheiden, gilt der Austausch von kohlenstoffgebundenem Wasserstoff gegen ein Fluor-Atom allgemein als isoster.²³ Tatsächlich entspricht das Fluoratom mit einem van der Waals-Radius von 1,47 Å in seiner Größe mehr dem Sauerstoff (1,52 Å) als einem Wasserstoffatom (1,20 Å).²⁴ Zahlreiche Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Substitution eines einzelnen

Wasserstoffatoms den sterischen Anspruch des betroffenen Moleküls nur geringfügig verändert.^{25,26}

Das isostere Verhalten gilt jedoch nur für einfach fluorierte Verbindungen, da der räumliche Anspruch von Alkylresten mit der Einführung mehrerer Fluoratome deutlich steigt. So entspricht das van der Waals-Volumen einer Trifluormethylgruppe mit $39,8 \text{ \AA}^3$ etwa dem Volumen eines Ethylrestes ($38,9 \text{ \AA}^3$).²⁷ Aufgrund der unterschiedlichen Geometrie beider Gruppen ist jedoch die Abschätzung des tatsächlichen Raumanpruchs einer Trifluormethylgruppe anhand des berechneten Volumens kaum möglich. Darüberhinaus handelt es sich dabei nicht um eine intrinsische Größe sondern um ein extrinsisches Phänomen, welches spezifisch für das jeweils betrachtete Molekül ist.²⁶ Dementsprechend variieren die experimentell bestimmten Werte für den Raumbedarf einer Trifluormethylgruppe z.T. stark und sind abhängig von dem für die Bestimmung gewählten Modellsystem (Abb. 2.1).

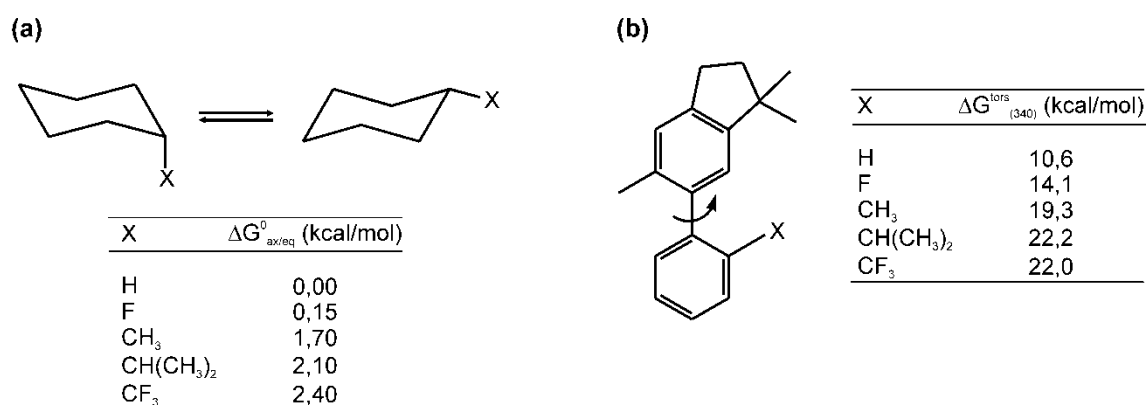


Abbildung 2.1. Experimentelle Bestimmung des Raumanpruchs verschiedener Substituenten. (a) Bestimmung der Konformationsenergie substituierter Cyclohexanderivate; (b) Abschätzung der sterischen Anspruchs über die Rotationsbarriere substituierter 6-Aryl-1,1,5-trimethylindane. Nach M. Schlosser.²⁸

Allgemein kann davon ausgegangen werden, dass der sterische Effekt einer Trifluormethylgruppe in etwa dem der deutlich größeren Isopropylgruppe (van der Waals-Volumen $56,2 \text{ \AA}^3$) entspricht. So lässt beispielsweise die Bestimmung des Energiebetrages, welcher benötigt wird um substituierte Cyclohexanderivate von der äquatorialen in die axiale Konformation zu überführen, auf einen etwas höheren sterischen Anspruch der Trifluormethylgruppe gegenüber eines Isopropylrestes schließen während die Bestimmung der Rotationsbarriere substituierter 6-Aryl-1,1,5-trimethylindane etwas geringere Werte für die Trifluormethylgruppe im Vergleich zum Isopropylrest liefert.²⁸

Neben der Substitution von Wasserstoffatomen ist vor allem der Austausch kohlenstoffgebundenen Sauerstoffs sowie von Hydroxylgruppen durch Fluor praktisch

relevant für das Wirkstoffdesign. So dienen beispielsweise Monofluoralkene (Abbildung 2.2.b) als hydrolysestabile Isostere von Peptidbindungen und finden Verwendung im Design von Proteaseinhibitoren.^{29,30} Dabei übernimmt Fluor die Position des Sauerstoffatoms, während die Doppelbindung den planaren Charakter der Peptidbindung imitiert.³¹ Eine andere Strategie zur Synthese hydrolysestabiler Amidisostere für die Entwicklung von Proteaseinhibitoren besteht im Austausch des Carbonylsauerstoffs gegen eine Trifluormethylgruppe (Abbildung 2.2.c).³² Hierbei dient die Trifluorethylamineinheit durch die niedrige Basizität des Stickstoffs, den isopolaren Eigenschaften der C-CF₃- und der C=O-Gruppe und einem CH(CF₃)-NH-CH-Winkel von ca. 120° einerseits als Mimetikum der Peptidbindung. Zum anderen wird durch die hohe Elektronendichte der CF₃-Gruppe sowie dem tetraedrischen C-Atom der Übergangszustand proteasekatalysierter Hydrolysereaktionen imitiert, wodurch eine starke Bindung im aktiven Zentrum der Protease erreicht wird.^{33,34}

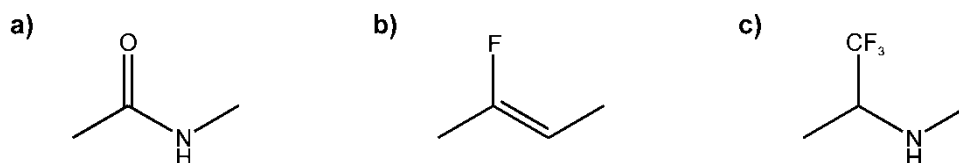


Abbildung 2.2. Fluorsubstituierte Alkene bzw. Alkylamine als Amidgruppenisostere. (a) Amidbindung, (b) Monofluoralken, (c) Trifluormethylamin.

2.1.2 Wasserstoffbrückenbindungen und polare Wechselwirkungen

Anders als aufgrund der hohen Elektronegativität und den freien Elektronenpaaren zu erwarten, stellt Fluor, bedingt durch die geringe Polarisierbarkeit, einen schlechten Wasserstoffbrückenakzeptor dar und ist nicht in der Lage mit stärkeren Akzeptoren (Sauerstoff oder Stickstoff) zu konkurrieren.³⁵ F...H-Brücken weisen mit 2,0 bis 3,2 kcal/mol deutlich geringere Energiewerte auf als beispielsweise O...H-Brücken (5 bis 10 kcal/mol). Darüberhinaus hat die Analyse der Kristallstrukturen zahlreicher Protein-Ligand-Komplexe nur wenige Beispiele geliefert in denen der Abstand zwischen Fluor und dem Wasserstoffatom einer Hydroxyl- oder Aminofunktion auf das Vorliegen von Wasserstoffbrückenbindungen schließen lässt.^{36,37} Dennoch sind einige Kristallstrukturen bekannt, die für die Ausbildung von C-F...H-Brücken sprechen.^{38,39} Allerdings handelt es sich bei diesen Beispielen meist um Systeme in denen alternative Wasserstoffbrückenbindungen aus sterischen Gründen nicht möglich sind.³⁵

Im Gegensatz zu den ungünstigen Eigenschaften als Wasserstoffbrückenakzeptor übt Fluor durch seinen stark elektronenziehenden Effekt und die damit verbundene Verringerung

der pK_a -Werte einen starken Einfluss auf Wasserstoffbrücken aus, die von benachbarten funktionellen Gruppen ausgebildet werden. Abhängig von der Entfernung zur jeweiligen Gruppe sowie dem Grad der Fluorierung können dabei erhebliche Verschiebungen im pK_a -Wert beobachtet werden (Tabelle 2.2).⁴⁰

Tabelle 2.2. pK_a -Werte fluoriertes Analoga von Essigsäure und Ethylamin.⁴¹

Verbindung	pK_a	Verbindung	pK_a
CH ₃ COOH	4,76	CH ₃ CH ₂ NH ₂	10,7
CH ₂ FCOOH	2,59	CH ₂ FCH ₂ NH ₂	8,97
CHF ₂ COOH	1,24	CHF ₂ CH ₂ NH ₂	7,52
CF ₃ COOH	0,23	CF ₃ CH ₂ NH ₂	5,7

Da elektrostatische Wechselwirkungen und Salzbrücken oft maßgeblich an der Bindung zwischen Biomolekülen, z.B. bei Protein-Protein-Wechselwirkungen,^{42,43} beteiligt sind, hat die Veränderung des pK_a oft erheblichen Einfluss auf die Affinität von Biomolekülen gegenüber ihren natürlichen Zielstrukturen.

Neben der direkten Beeinflussung intermolekularer Wechselwirkungen kann sich die elektronenziehende Wirkung von Fluorsubstituenten auch innerhalb eines Moleküls positiv auf die Stabilität und Funktion der betroffenen Verbindung auswirken. So wird beispielsweise angenommen, dass die erhöhte fungizide Wirkung des in Abbildung 2.3 dargestellten Difluormethylamidopyrazols im Vergleich zum entsprechenden Trifluormethyl-Analogon auf einer Stabilisierung der Konformation durch eine mögliche Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff und dem aciden H-Atom der Difluormethylgruppe beruht.⁴⁴

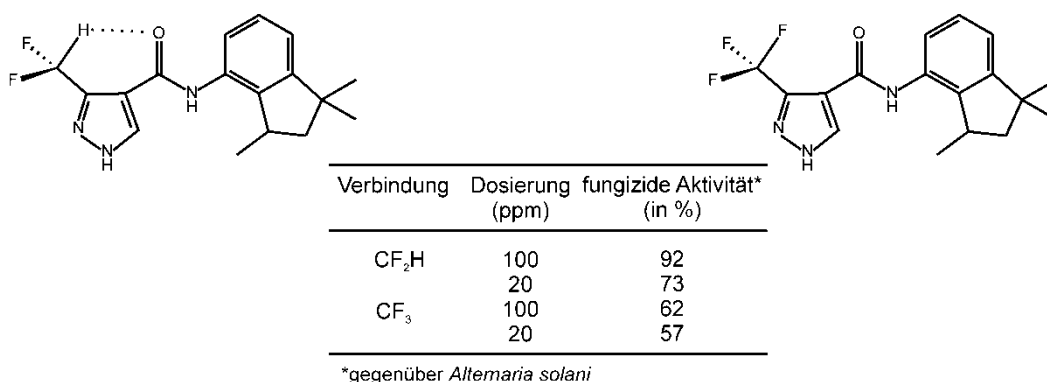


Abbildung 2.3. Struktur und fungizide Wirkung unterschiedlich fluoriertes Methylamidopyrazole. Nach Bégué et al.²²

Pharmakologisch interessant ist besonders die Verringerung der Basizität von Aminogruppen durch die Einführung eines oder mehrerer Fluoratome.⁴⁵ Während eine hohe Basizität gewöhnlich wichtig für die Bindungseigenschaften eines Wirkstoffs ist, wirkt sie sich negativ auf die biologische Verfügbarkeit des Moleküls aus, da die positive Ladung die Passage der Zellmembran erschwert. Die Herausforderung besteht darin, das Optimum zwischen diesen konkurrierenden Effekten zu erreichen, wie am Beispiel fluorierter Liganden des menschlichen Serotonin-Rezeptors 5HT_{1D} gezeigt werden konnte (Abbildung 2.4).⁴⁶ Durch den Einbau eines Fluoratoms konnte hier die Plasmakonzentration vervielfacht und gleichzeitig die Wirksamkeit des Liganden weitgehend erhalten werden.

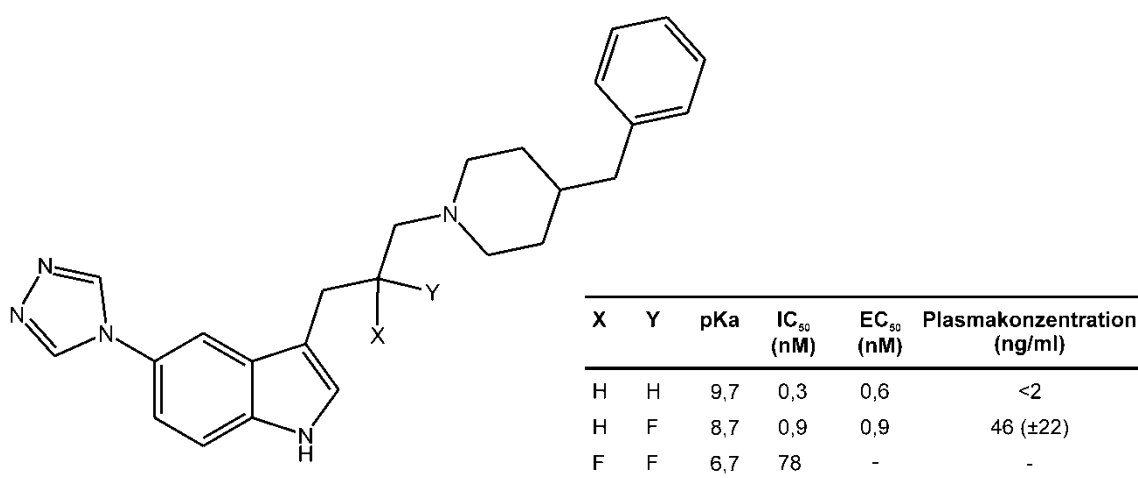


Abbildung 2.4. Einfluss des pK_a auf die Bindungseigenschaften (IC₅₀), die Wirksamkeit (EC₅₀) und die biologische Verfügbarkeit strukturell verwandter 5-HT_{1D}-Agonisten.⁴⁶

2.1.3 Hydrophobie, Lipophilie und der „Fluoreffekt“

Eine wichtige Charakteristik potentieller Wirkstoffmoleküle stellt ihre Lipophilie dar, welche entscheidend für die Fähigkeit der Verbindung ist, Lipidmembranen zu passieren und damit wesentlich zur biologischen Verfügbarkeit des Wirkstoffs beiträgt. Die Quantifizierung der Lipophilie organischer Verbindungen erfolgt häufig über die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten in Wasser/Octanol ($\log P_{\text{Octanol}}$). Ein hoher $\log P$ kennzeichnet dabei eine hohe Hydrophobie der untersuchten Verbindung und gilt gleichzeitig als Indiz für eine hohe Lipophilie. Allerdings gilt diese Korrelation von Hydrophobie und Lipophilie im Fall fluorierter Moleküle lediglich für aromatische Verbindungen, bei denen der Austausch eines Wasserstoffatoms gegen Fluor oder eine Fluoralkylgruppe zur Erhöhung des $\log P$ -Wertes führt. Die am stärksten hydrophoben

Substituenten stellen dabei CF_3^- , CF_3O^- sowie CF_3S -Gruppen dar, welche breite Anwendung bei der Entwicklung von Pflanzenschutzmitteln finden.²² In aliphatischen Verbindungen dagegen führt der Einbau von Fluoratomen zu einer Erhöhung der Hydrophobie während gleichzeitig eine Abnahme der Lipophilie beobachtet werden kann.²⁶ In perfluorierten Molekülen können Hydrophobie und Lipophobie so stark ausgeprägt sein, dass sich diese Verbindungen weder in Wasser noch in organischen Lösemitteln lösen und eine dritte Phase ausbilden. Eine in diesem Maß ausgeprägte Lipophobie hydrophober Verbindungen ist bisher nur für fluorierte Verbindungen bekannt und wird als „Fluoreffekt“ bezeichnet.⁴⁷ Neben technischen Anwendungen wie der gezielten Separation fluorierte Verbindungen aus Reaktionsmischungen eröffnet dieses Phänomen weitere interessante Möglichkeiten für das Design funktioneller Biomoleküle.^{48,49} So konnten beispielsweise spezifisch miteinander wechselwirkende, fluorierte Aminosäuren enthaltende Peptide synthetisiert werden. Durch den „Fluoreffekt“ kommt es dabei zur spezifischen Zusammenlagerung der fluorierten Aminosäureseitenketten und dadurch zur Separation der entsprechend modifizierten Peptide.⁵⁰

2.2 Fluorierte Verbindungen biologischen Ursprungs

Während die Anzahl anthropogener organischer Fluorverbindungen kontinuierlich ansteigt sind derzeit nur 12 fluorierte Verbindungen biologischen Ursprungs bekannt (Abbildung 2.5).^{51,52} Fluoracetat stellt den bekanntesten Vertreter dieser kleinen Naturstoffklasse dar und wurde erstmals 1943 in der afrikanischen Pflanze *D. cymosum* gefunden.⁵² Inzwischen konnte diese Verbindung in einer Reihe weiterer, hauptsächlich in tropischen und halbtropischen Regionen beheimateter Pflanzen nachgewiesen werden. *In vivo* wird Fluoracetat in Fluorcitrat umgewandelt welches Aconitase, ein Enzym des Citrat-Zyklus, hemmt und verantwortlich für die toxische Wirkung dieser Verbindung ist.

Die toxischen Eigenschaften der westafrikanischen Giftpflanze *Dichapetalum toxicarium* werden ebenfalls auf fluororganische Verbindungen zurückgeführt. Neben geringen Mengen an Fluoracetat wurden in den Samen dieser Pflanzen vor allem ω -Fluorölsäure, ω -Fluorpalmitinsäure sowie geringe Mengen weiterer ω -fluorierte Fettsäuren nachgewiesen.⁵³ Die Ausgangsverbindung für die Biosynthese dieser ω -fluorierte Fettsäuren stellt vermutlich Fluoracetyl-CoA dar, welches von der Fettsäuresynthase dieser Pflanze akzeptiert und anstelle von Acetyl-CoA im ersten Schritt der Fettsäuresynthese an das Malonylacyl-Carrier-Protein kondensiert wird.¹³

Neben den genannten Pflanzen stellen einige Bakterien der Gattung *Streptomyces* eine natürliche Quelle für Fluoracetat sowie zwei weitere fluororganische Verbindungen dar. So konnte gezeigt werden, dass *Streptomyces cattleya* in Gegenwart von Fluoridionen 4-Fluorthreonin sowie Fluoracetat synthetisiert.^{13,54} Inzwischen konnte aus diesem Organismus ein Enzym isoliert werden, das die Bildung der C-F-Bindung durch Kombination von S-Adenosyl-L-Methionin und F^- katalysiert, wobei 5'-Fluor-5'-desoxyadenosin und L-Methionin entstehen.^{55,56,57} Bis heute handelt es sich dabei um das einzige bekannte Enzym, das in der Lage ist, die Umwandlung von Fluorid in organisch gebundenes Fluor zu katalysieren.

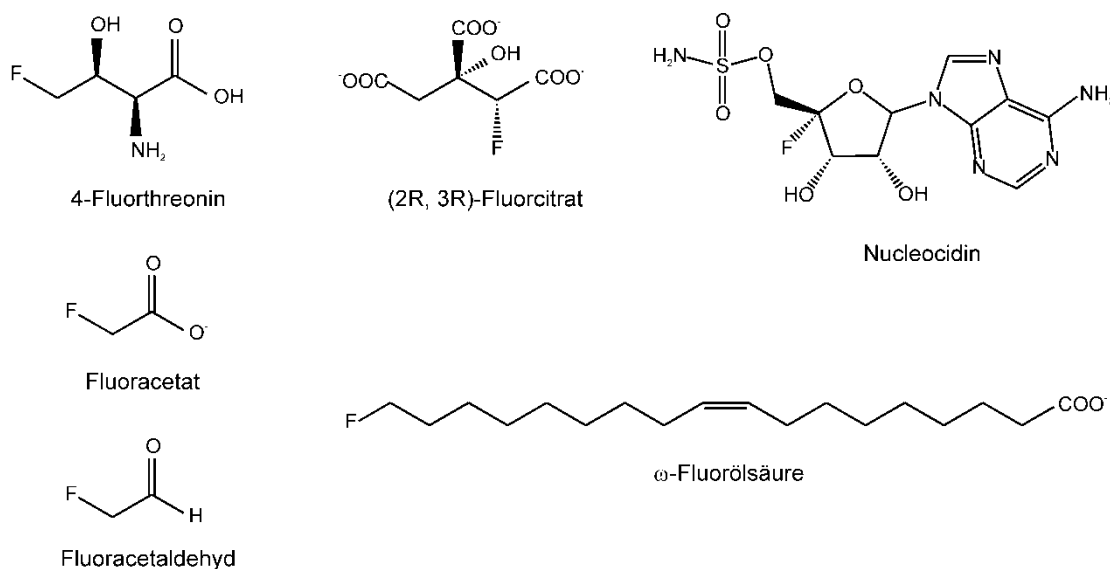


Abbildung 2.5. Fluororganische Verbindungen biologischen Ursprungs.

Im Jahr 1957 wurde aus dem Organismus *Streptomyces calvus* das fluorierte (aufgrund der hohen Toxizität klinisch jedoch nicht relevante) Antibiotikum Nucleocidin isoliert. Die Lage des Fluoratoms am C4-Atom der Ribose lässt nicht auf eine Biosynthese dieses Moleküls ausgehend von einem Fluoracylfragment schließen. Allerdings sind bisher alle Versuche diesen Naturstoff erneut aus unterschiedlichen *S. calvus*-Kulturen zu isolieren gescheitert und damit eine Aufklärung des Mechanismus dieser Reaktion nicht möglich.

2.3 Fluorierte Aminosäuren in Peptiden und Proteinen

Peptide und Proteine sind an praktisch jedem biologischen Prozesse beteiligt und von essentieller Bedeutung für alle Lebensvorgänge. Sie bilden z.B. als Strukturproteine, Rezeptoren oder Enzyme die strukturelle und funktionelle Grundlage sämtlicher

Lebensvorgänge. Die Bedeutung von Peptiden und Proteinen bei der Steuerung lebensnotwendiger Vorgänge wie dem Stoffwechsel, der Signaltransduktion oder der Immunabwehr erklärt das hohe Interesse der Pharmakologie an dieser Verbindungsklasse. Als Grundbausteine von Peptiden und Proteinen bilden Aminosäuren die Grundlage für die vielfältigen Eigenschaften dieser Stoffklasse. Die Erweiterung des Pools der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren durch chemisch synthetisierte Aminosäurebausteine mit zusätzlichen Funktionen erlaubt die gezielte Modifizierung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften von Peptiden und Proteinen und stellt eines der wichtigsten Werkzeuge bei der Entwicklung peptidbasierter Wirkstoffe dar. Bedingt durch die einzigartigen Eigenschaften des Fluoratoms und das geringe Vorkommen dieses Elements in Verbindungen biologischen Ursprungs, erlauben besonders fluoridierte Aminosäuren eine Vielzahl vielversprechender Modifizierungen.

2.3.1 Der Einbau fluorierter Aminosäuren in Peptide und Proteine

Für den Einbau fluorierter Aminosäuren in Peptide und Proteine stehen prinzipiell drei Methoden zur Verfügung. Mit Hilfe der chemischen Synthese unter Verwendung der automatisierten Festphasenpeptidsynthese ist es möglich nahezu jede beliebige nicht-natürliche Aminosäure in Polypeptide einzubauen. Dabei haben sich die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode durch die Entwicklung verschiedener Techniken zur Segmentkondensation und nativen Ligation erheblich erweitert, sodass auch kleinere Proteine über diese Methode zugänglich sind.^{58,59} So konnten beispielsweise eine modifizierte Variante des Glykoproteins Erythropoetin (166 AS) und eine aus D-Aminosäure aufgebaute Spiegelform der HIV-1-Protease (99 AS) chemisch synthetisiert werden.⁶⁰ Der Vorteil liegt hierbei zweifellos in der Flexibilität bei der Wahl der Aminosäurebausteine. Dem gegenüber stehen jedoch eine starke Einschränkung in der Größe der zu synthetisierenden Peptide sowie ein verhältnismäßig großer synthetischer Aufwand.

Die Synthese größerer Strukturen erlauben verschiedene *in vivo*-Techniken welche auch den Einbau fluorierter Aminosäuren in rekombinante Proteine ermöglichen. Die Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass der jeweilige Aminosäurebaustein vom natürlichen Proteinbiosyntheseapparat akzeptiert wird.

Eine große Zahl fluorierter Analoga natürlicher Aminosäuren wird sowohl von der jeweiligen Aminoacyl-tRNA-Synthetase als auch vom Ribosom erkannt und kann anstelle natürlicher Aminosäuren in die wachsende Peptidkette eingebaut werden. Für die Gewinnung des gewünschten rekombinanten Proteins werden meist für die

entsprechende natürliche Aminosäure auxotrophe Bakterienstämme verwendet, welche nicht in der Lage sind diese Aminosäure zu synthetisieren und für ihr Wachstum auf das Vorhandensein dieses Bausteins im Medium angewiesen sind. Anstelle der natürlichen Aminosäure wird während der Expression des gewünschten Proteins jedoch ausschließlich das fluorierte Analogon im Medium zur Verfügung gestellt, welches von der Bakterienzelle aufgenommen und anstelle der natürlichen Aminosäure an die entsprechende t-RNA geknüpft werden kann. Mit Hilfe des natürlichen Protein-Biosyntheseapparates wird schließlich die nicht natürliche Aminosäure anstelle ihres natürlichen Gegenstücks in das Protein eingebaut.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Biosynthese der jeweiligen natürlichen Aminosäure zu inhibieren, wodurch auf den Einsatz eines auxotrophen Bakterienstamms verzichtet werden kann. Auf diesem Prinzip beruht die von Pellecchia *et al.* beschriebene Methode zum *in vivo*-Einbau von 5-Fluortryptophan, bei der durch die Zugabe von 3- β -Indolacrylsäure die Biosynthese der Aminosäure Tryptophan inhibiert wird. Vor der Induktion der Proteinexpression wird dem Medium 5-Fluortryptophan zugegeben, welches anstelle von Tryptophan in das exprimierte Protein eingebaut wird.⁶¹

Mit Hilfe der beschriebenen Methoden ist es möglich eine große Zahl fluorierter Aminosäuren in Proteine einzubauen. Insbesondere fluorierte Varianten aromatischer (Tyr, Phe, Trp)^{62,63,64} sowie aliphatischer hydrophober Aminosäuren (Met, Leu, Ile, Val)^{65,66,67,68} konnten bisher auf diese Weise erfolgreich in verschiedene Proteine eingebaut werden. Allerdings werden bei dieser Technik nahezu alle Positionen der natürlichen Aminosäure durch die fluorierte Variante substituiert.

Obwohl der vollständige Austausch einer natürlichen Aminosäure gegen einen modifizierten Aminosäurebaustein eine Vielzahl interessanter Anwendungen ermöglicht, ist es mitunter erwünscht nur eine einzige Aminosäureposition zu substituieren. Der ortsspezifische Einbau einer nicht-natürlichen Aminosäure wurde erstmals von den Arbeitsgruppen um Prof. P.G. Schultz und Prof. A.R. Chamberlain beschrieben.^{69,70} Dabei wird eines der drei Stopp-Codons (UAA, UAG, UGA), welche nicht für eine Aminosäure codieren sondern den Abbruch der Peptidsynthese signalisieren, für den Einbau der nicht-natürlichen Aminosäure genutzt. Da nur ein Stopp-Codon für den Abbruch der Translation notwendig ist, stehen prinzipiell zwei zusätzliche Codons für den Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren zur Verfügung. Durch die Fehlbeladung sog. Nonsense-Suppressor-tRNAs (tRNAs welche an der Position eines Stopp-Codons eine natürliche Aminosäure einbauen anstatt den Abbruch der Proteinbiosynthese einzuleiten⁷¹) mit einer nicht-natürlichen Aminosäure, kann diese als 21igste Aminosäure, codiert durch eines der drei Stopp-Codons, in das Protein eingebaut werden. Nach der chemischen Fehlacylierung von Suppressor-tRNAs ist es möglich, auf diesem Wege unter Verwendung von *in vitro*-

Translationssystemen eine Vielzahl nicht-natürlicher Aminosäurebausteine in Proteine einzubauen.^{72,73}

Inzwischen hat diese Methode eine Reihe von Weiterentwicklungen erfahren und ermöglicht auch den ortsgerichteten Einbau nicht-natürlicher Aminosäuren *in-vivo*.^{74,75,76}

Die Grundlage hierfür bilden wirkungsvolle Methoden zur Selektion spezifischer Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, welche nicht-natürliche Aminosäuren aktivieren und mit einer entsprechenden Suppressor-tRNA verknüpfen. Neben verschiedenen nicht-natürlichen Aminosäuren konnten mit Hilfe dieser Strategie auch die als NMR-Sonden verwendeten fluorierten Aminosäuren p-Trifluormethylphenylalanin und p-Trifluormethoxyphenylalanin erfolgreich in Proteine eingebaut werden.^{77,78,79}

2.3.2 Fluorierte Aminosäuren für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen

Die natürliche Häufigkeit des ¹⁹F-Isotops sowie das Fehlen natürlicher Hintergrundsignale machen fluorierte Aminosäurebausteine zu attraktiven NMR-Sonden für die Untersuchung von Proteinstrukturen und Interaktionen zwischen Proteinen und deren Wechselwirkungspartnern.^{80,81} Der Austausch eines einzelnen H-Atoms gegen ein F-Atom wird strukturell gewöhnlich toleriert, sodass durch den Einbau der NMR-Sonde nur geringe Veränderungen zu erwarten sind.⁸² Auf der anderen Seite ist das NMR-Signal des Fluor-Labels ausreichend sensitiv gegenüber räumlichen und elektrostatischen Veränderungen. Die Resonanzen der freien und gebundenen Zustände unterscheiden sich gewöhnlich deutlich und ermöglichen u.a. die kinetische Untersuchung von Faltungs- und Bindungsprozessen. So lassen sich beispielsweise Faltungskinetiken ermitteln, indem spezifische Aminosäurereste, welche in verschiedenen Sekundärstrukturelementen lokalisiert sind, durch ihre fluorierten Analoga substituiert werden. Die spektroskopische Verfolgung der chemisch oder thermisch induzierten Denaturierung liefert dann Einblick in den schrittweisen Prozess der Entfaltung und in die Stabilität der verschiedenen dabei auftretenden Strukturelemente.

Gewöhnlich finden dabei fluorierte Analoga der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan Verwendung, da diese überdurchschnittlich oft im hydrophoben Inneren globulärer Proteine auftreten und an der Ausbildung von Bindungstaschen beteiligt sind. Darüberhinaus bieten sie den Vorteil, dass sie vom natürlichen Proteinbiosyntheseapparat akzeptiert werden und daher verhältnismäßig einfach in Proteine eingebaut werden können (siehe Punkt 2.3.1).

Auf diese Weise konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich bei der Harnstoff-induzierten Denaturierung des Enzyms mADA (Maus-Adenosin-Deaminase) verschiedene Regionen des Enzyms nacheinander entfalten und heterogene Übergangsstrukturen während des Entfaltungsprozesses auftreten. Hierfür wurden mittels ^{19}F -NMR und Markierung mit 6-F-Trp ortsspezifisch die lokalen Strukturveränderungen sowie die Eigenschaften der während der Denaturierung auftretenden Zwischenstufen untersucht.⁸³ Neben der Charakterisierung von Faltungs- und Entfaltungsvorgängen haben sich fluorierte Aminosäurebausteine als Hilfsmittel für die Untersuchung von Peptid-Membranwechselwirkungen und hier insbesondere der Verfolgung struktureller Änderungen membrangebundener Peptide mittels Festkörper- ^{19}F -NMR bewährt.⁸⁴ Für die Bestimmung der exakten räumlichen Position einer fluorierten Seitenkette, wie sie beispielsweise für die Untersuchung der Konformation einer bestimmten Peptidregion erforderlich ist, sollte das Fluorlabel idealerweise in einer definierten Position mit der Peptidkette verknüpft sein und einen möglichst geringen Freiraum der Seitenketten-Torsionswinkel aufweisen. Da diese Anforderung von den meisten fluorierten Analoga natürlicher Aminosäuren nicht erfüllt wird, wurden mehrere nicht-natürliche fluorierte Aminosäuren speziell für den Einsatz als NMR-Label entwickelt.^{85,86,87}

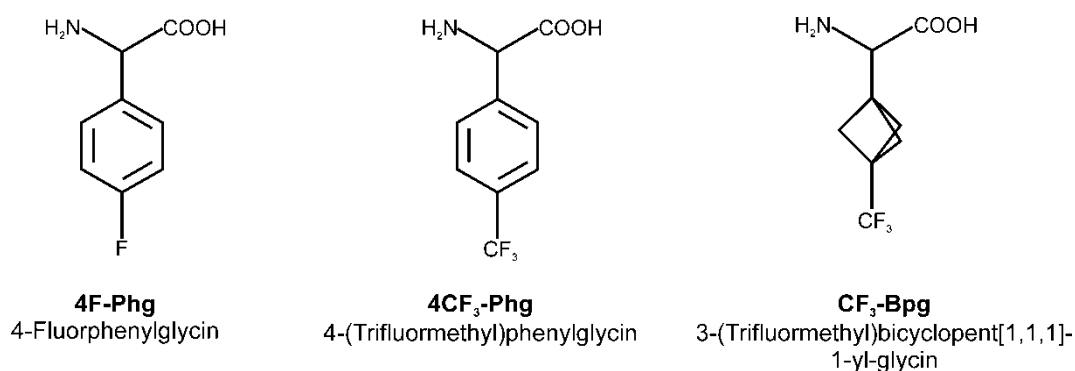


Abbildung 2.6. Konformativ eingeschränkte, als ^{19}F -NMR-Sonden verwendete Aminosäure-Derivate.^{88,89,90}

Eine Auswahl erfolgreich für ^{19}F -NMR-Studien verwendeter Aminosäure-Derivate ist in Abbildung 2.6 dargestellt. Durch die Substitution verschiedener hydrophober Reste konnten mit Hilfe dieser Aminosäurederivate wertvolle Erkenntnisse über den Wirkmechanismus sowie die strukturellen Veränderungen innerhalb membranaktiver, antimikrobieller Peptide im membrangebundenem Zustand gewonnen werden.⁹¹

2.3.3 Fluorierte Aminosäuren in biologisch aktiven Peptiden

Der Einbau fluorierter Aminosäuren verspricht eine gezielte Modifizierung der Eigenschaften biologisch aktiver Peptide. Besonders fluorierte Varianten hydrophober Aminosäuren bieten sich aufgrund der erhöhten Hydrophobie von Fluoralkylgruppen für den Einbau in antimikrobielle Peptide an. Bei diesen handelt es sich gewöhnlich um kurze, amphiphile Peptide, welche durch die Ausbildung von Poren oder durch das Auseinanderreißen der Lipiddoppelschicht zur Zerstörung von Bakterienzellen führen.^{92,93}

So führt beispielsweise die Einführung einer Trifluormethylgruppe zur Erhöhung der antimikrobiellen Wirkung kurzer kationischer Peptide.⁹⁴ Durch den Einbau von 4-Fluorphenylalanin (4-fF) bzw. 4-Trifluorphenylalanin (4-cf₃F) in kurze, alternierend aus positiv geladenen und hydrophoben Aminosäuren aufgebaute Modellpeptide konnte die antimikrobielle Wirkung gegenüber gram-positiven und gram-negativen Bakterien verstärkt werden. Die Substitution durch einen Trifluormethylrest zeigte dabei einen stärkeren Effekt als der Einbau eines einzelnen Fluoratoms. Der Vergleich der Retentionszeiten der synthetisierten Peptide zeigte erwartungsgemäß eine gute Korrelation zwischen Hydrophobie und lytischer Aktivität. Dennoch scheint der stärkere hydrophobe Charakter nicht die einzige Ursache für die verbesserte antimikrobielle Wirkung darzustellen. So gleicht die Retentionszeit eines CF₃-substituierten Peptids der einer antimikrobiell deutlich weniger aktiven Variante, die Tryptophan anstelle von 4-cf₃F enthält. Möglicherweise spielt auch hier der unter 2.3.4.2 beschriebene Fluoreffekt eine Rolle, indem durch Aggregation der Peptide die Ausbildung von Poren innerhalb der Membran begünstigt wird.

Weitere Studien belegen den Einfluss fluorierter Aminosäuren auf die Wechselwirkung zwischen Peptiden und Lipidmembranen. Beispielsweise verstärkt die Substitution verschiedener Leucin-Reste durch Trifluorleucin die Selbstaggregation sowie die membranaktive Wirkung von Melittin, einem Bestandteil des Bienengifts.⁹⁵

Neben der biologischen Wirkung konnte durch den Einbau fluorierter Aminosäure auch die Proteasestabilität membranaktiver Peptide verbessert werden. Ein Beispiel stellt hier die Substitution von zwei Leucin- und zwei Isoleucin-Resten des antimikrobiellen Peptids MSI-78 durch Hexafluorleucin dar. Während durch diesen Austausch die antimikrobielle Wirkung der als Fluorogainin-1 bezeichneten Verbindung weitgehend erhalten bleibt, zeigt diese im Vergleich zum Wildtyp im membrangebundenem Zustand eine deutlich höhere Stabilität gegenüber Trypsin und Chymotrypsin.⁹⁶

Auch für fluorierte Varianten der antimikrobiellen Peptide Buforin und Magainin konnte eine erhöhte Proteasestabilität beobachtet werden.⁹⁷ In beiden Fällen blieb die lytische Aktivität gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien erhalten oder konnte

durch die Substitutionen verstärkt werden. Als Ursache für die erhöhte Stabilität gegenüber Trypsin werden der höhere sterische Anspruch von HFL sowie die elektronische Beeinflussung der Amidbindung vermutet. Gestützt wird diese These durch die im Vergleich zu Leucin deutlich erhöhte Acidität der HFL-Amidfunktion.

Für andere biologisch aktive Peptide konnte durch den Einbau fluorierter Aminosäuren ebenfalls eine höhere proteolytische Stabilität erzielt werden.⁹⁸ Ein Beispiel hierfür ist das Glucagon-ähnliche Peptid-1 (GLP-1).⁹⁹ GLP-1 stimuliert die Insulinsekretion und unterdrückt die Glucagonsekretion sowie den Appetit, wodurch es sich als potentielles Therapeutikum für die Behandlung von Typ2-Diabetes anbietet. Allerdings ist der therapeutische Nutzen dieses Peptids aufgrund der schnellen Inaktivierung durch die Serin-Protease Dipeptidyl-Peptidase IV (DPP IV) stark eingeschränkt (die Halbwertszeit nach intravenöser Verabreichung beträgt 2 min). Durch den Austausch der Aminosäure Phenylalanin in Position 9 (P1') gegen Hexafluorleucin konnte die Stabilität von GLP-1 gegenüber DPP IV um etwa 50% erhöht werden ohne die biologische Wirkung signifikant zu beeinträchtigen. Die Substitution des Alanin-Restes in Position 8 (P1) durch Hexafluorleucin führte sogar zu einer vollständigen Resistenz gegenüber DPP IV, wobei die biologische Aktivität durch diesen Austausch nur verhältnismäßig gering beeinträchtigt wurde.

2.3.4 Modifizierung und Stabilisierung von Proteinstrukturen durch den Einbau fluorierter Aminosäuren

Der Einbau eines oder mehrerer Fluoratome in medizinische Wirkstoffe stellt eine erprobte Strategie zur Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften dieser Verbindungen dar. Im Vergleich dazu ist der Einsatz fluorierter Aminosäurebausteine zur gezielten Modifizierung von Proteinstrukturen eine verhältnismäßig junge Disziplin. Die Erhöhung der thermischen Stabilität verschiedener Strukturelemente durch den Einbau fluorierter Aminosäuren sowie das Design von sich selbst sortierenden Peptidaggregaten haben das Potenzial fluorierter Bausteine gezeigt und den Einbau fluoralkylsubstituierter Aminosäuren zu einer festen Größe im Proteinengineering werden lassen. Dabei hat sich auch hier besonders der Einsatz fluorierter Analoga hydrophober Aminosäuren sowie fluorsubstituierter Prolin-Varianten etabliert und soll im Folgenden an einigen Beispielen vorgestellt werden.

2.3.4.1 Fluorprolin

Unter den proteinogenen Aminosäuren nimmt Prolin eine Sonderstellung ein. Die durch den Pyrrolidinring bedingte Starrheit dieser Struktureinheit ist die Ursache für die stark helix- und β -faltblattbrechende Wirkung des Prolins. Während natürlich auftretende Peptidbindungen gewöhnlich aus sterischen Gründen ausschließlich in der *trans*-Konformation vorliegen, gilt diese Einschränkung für Prolylamidgruppen nicht, welche sowohl in der *cis*- als auch der *trans*-Konformation zu finden sind.

Darüberhinaus kann der Pyrrolidinring des Prolins zwei unterschiedliche Konformationen einnehmen. Diese unterscheiden sich in der Position des C(γ)-Atoms relativ zur Ringebene und werden als C(γ)-*exo*- bzw. C(γ)-*endo*-Pucker bezeichnet. Sowohl die *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidyl-Prolin-Bindung, als auch die Konformation des Prolin-Rings haben einen starken Einfluss auf die Proteinfaltung und können durch elektronenziehende C(γ)-Ringsubstituenten gesteuert werden.¹⁰⁰

Während (2*S*,4*R*)-4-Fluorprolin (4*R*-Flp) die *trans*-Konformation sowie den C(γ)-*exo*-Pucker, favorisiert, liegt (2*S*,4*S*)-4-Fluorprolin (4*S*-Flp) bevorzugt in der *cis*-Konformation und als C(γ)-*exo*-Pucker vor (Abbildung 2.7). Diese Eigenschaften fluoriertes Prolin-Analoga wurden u.a. für die Synthese stabiler Collagen-Tripelhelices verwendet.¹⁰¹

Collagen ist das in Tieren am weitesten verbreitete Protein und besteht aus drei einzelnen Peptidsträngen, welche rechtsgängig umeinander gewunden sind und eine stabile Tripelhelix bilden. Jeder Strang besteht dabei aus ca. 300 Wiederholungen der Sequenz X-Y-Gly, wobei in den Positionen X und Y bevorzugt die Aminosäuren Prolin (X) bzw. 4(*R*)-Hydroxyprolin (Y) zu finden sind.

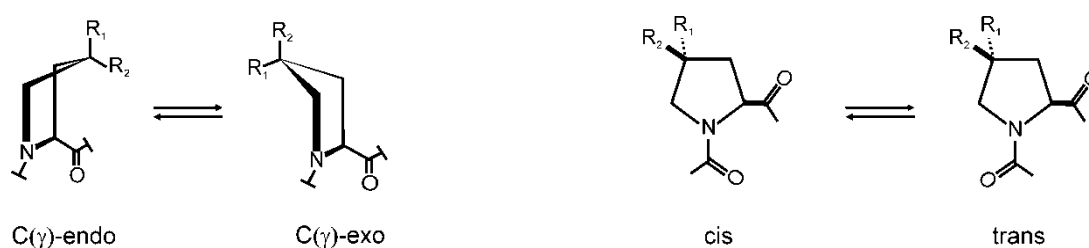


Abbildung 2.7. Ringkonformationen und *cis*-/*trans*-Isomerisierung 4-substituierter Prolin-Reste. Die C(γ)-*endo*-Konformation ist begünstigt für $R_1 = H$ und $R_2 = F$ während für $R_1 = F$ und $R_2 = H$ die C(γ)-*exo*-Konformation begünstigt ist. Für $R_1 = H$ und $R_2 = F$ [(2*S*,4*S*)-Prolin] liegen die durch Prolin gebildeten Peptidbindungen vorzugsweise in der *cis*-Form vor, während für $R_1 = F$ und $R_2 = H$ [(2*S*,4*R*)-Prolin] die *trans*-Form bevorzugt wird.

Während lange Zeit angenommen wurde, der stabilisierende Effekt von 4(*R*)-Hydroxyprolin in der Y-Position resultiert aus zusätzlichen Wasserstoffbrücken, die von der

Hydroxylgruppe ausgebildet werden, konnte diese Annahme durch den Einbau von 4(*R*)-Fluorprolin in der *Y*-Position und die daraus resultierende Stabilisierung der Collagen-Triple-Helix widerlegt werden. Kristallstrukturen von Collagen-Helices haben gezeigt, dass die Prolin-Reste der *X*-Positionen in der *C*(γ)-*endo*-Konformation vorliegen, während in Position *Y* die *C*(γ)-*exo*-Konformation bevorzugt wird.¹⁰² Die beobachtete Stabilisierung der Collagen-Helix erklärt sich somit durch die bevorzugte *C*(γ)-*exo*-Konformation des 4*R*-Flp.^{103,104} Die erfolgreiche Synthese stabiler (4*S*-Flp-Pro-Gly)₇ und (4*S*-Flp-Pro-Gly)₁₀-Triple-Helices unterstützt diese Theorie und zeigt die stabilisierende Wirkung des 4-Fluorprolins auf die Collagen-Struktur.^{104,105}

Im Gegensatz dazu bildet (4*S*-Flp-4*R*-Flp-Gly)₇ aus sterischen Gründen keine Collagen-Helices. Stattdessen bildet (4*S*-Flp-4*R*-Flp-Gly)₇ in Kombination mit (Pro-Pro-Gly)₇ spezifische heteromere Triple-Helices und könnte zum Design selbstassemblierender helikaler Strukturen dienen.¹⁰⁶

Ein anderes Beispiel für die strukturstabilisierende Wirkung von 4-Fluorprolin zeigt sich in der gegenüber dem Wildtyp erhöhten Stabilität einer 4*R*-Flp substituierten Elastin-Variante. Die höhere Stabilität des 4*R*-Flp-Peptids wird in diesem Beispiel auf die enge Korrelation der bevorzugten *C*(γ)-*exo*-Konformation des 4*R*-Flp und der räumlichen Orientierung des Prolin-Restes in der Typ-II- β -Schleife des Elastins zurückgeführt.¹⁰⁷

Budisa *et al.* beschreiben mit der Synthese fluorierter Varianten des grün fluoreszierenden Proteins EGFP den Einbau von 4-Fluorprolin in komplexere Proteinstrukturen.¹⁰⁸ GFPs enthalten in ihrer Primärstruktur 10 Prolin-Reste von denen neun in Form von *trans*-Peptidbindungen vorliegen und deren langsame *cis/trans*-Isomerisierung erheblichen Einfluss auf die Faltungsgeschwindigkeit des Proteins ausüben.¹⁰⁹

Mit dem Ziel, die geringe Faltungsgeschwindigkeit des EGFP zu erhöhen, wurden alle Prolin-Reste des Proteins durch 4*R*-Flp bzw. 4*S*-Flp ersetzt. Während die Expression von 4*R*-Flp-EGFP irreversibel fehlgefaltete *inclusion bodies* lieferte, konnte 4*S*-Flp-EGFP als lösliches, fluoreszierendes Protein isoliert werden. Obwohl durch den Einbau von 4*R*-Flp die Konformation der neun in *trans*-Form vorliegenden Prolin-Reste stabilisiert wird, erlaubt der Einbau von 4*R*-Flp offensichtlich keine korrekte Faltung des EGFP. Demgegenüber scheint 4*S*-Flp trotz des gegenteiligen Effektes auf die Peptidyl-Prolyl-Bindung keinen negativen Effekt auf die Faltung zu haben. Vielmehr zeigte die 4*S*-Flp-EGFP-Variante nach thermischer Denaturierung eine deutlich höhere Rückfaltungsrate im Vergleich zum Wildtyp, wodurch gezeigt werden konnte, dass der *cis/trans*-Isomerisierung der Prolin-Bindungen bei der Faltung des EGFP eine weitaus geringere Bedeutung zufällt als dem Pyrrolidin-Ring-*Pucker*. Offensichtlich führt das Fluoratom in der *C*(γ)-*endo*-Konformation innerhalb des EGFP zur Ausbildung neuer dipolarer Wechselwirkungen und unterstützt auf diese Weise den Faltungsprozess.¹⁰⁸

Eine Vielzahl weiterer Studien hat den Einfluss fluoriertes Prolin-Reste auf die Struktur sowie die biologische Wirkung verschiedener Peptide und Proteine gezeigt und verdeutlicht die Einsatzmöglichkeiten dieser fluorierten Aminosäuren im Protein-engineering.¹¹⁰

2.3.4.2 Fluorierte Aminosäuren in hydrophoben Peptidregionen

Anhand verschiedener Modellsysteme sowie durch den Einbau in natürliche Proteine wurde in den vergangenen Jahren der Einfluss fluoriertes hydrophober Aminosäuren auf Proteinstrukturen intensiv untersucht. Dabei hat sich besonders das α -helikale *coiled coil*-Faltungsmotiv (siehe 4.2.1) als geeignetes Modell erwiesen.¹¹¹ Dementsprechend stammt ein Großteil der bis heute gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des Einflusses fluoriertes Aminosäuren auf die Faltung und die strukturelle Stabilität von Peptiden und Proteinen aus Untersuchungen an diesem Strukturmotiv.

In verschiedenen Studien konnten gezeigt werden, dass der Austausch von Aminosäuren innerhalb des hydrophoben Kerns gegen fluorierte Analoga eine Stabilisierung der *coiled coil*-Struktur nach sich zieht. So führt beispielsweise die Substitution von Leucin in den **d**-Positionen der *coiled coil*-Region des Transkriptionsfaktors GCN4 gegen 5,5,5-Trifluorleucin (TFL) bzw. 5,5,5,5',5',5'-Hexafluorleucin (HFL) zu einer erhöhten thermischen und chemischen Stabilität ohne dabei die DNA-Bindungseigenschaften des Peptids zu beeinträchtigen.^{68,112} Durch den zusätzlichen Austausch der in den **a**-Positionen lokalisierten Valin-Reste gegen 4,4,4-Trifluorvalin (4TFV) lies sich dieser Effekt zusätzlich verstärken.¹¹³

Die Haupttriebkraft für die Bildung von *coiled coil*-Dimeren stellt der Ausschluss der hydrophoben Aminosäuren in den **a**- und **d**-Positionen von der wässrigen Umgebung dar.¹¹⁴ Der beobachtete Stabilitätsgewinn ist daher vermutlich in erster Linie eine Folge der höheren Hydrophobie der fluorierten Aminosäuren im Vergleich zu ihren natürlichen Analoga. Darüberhinaus spielt der sterische Anspruch der hydrophoben Reste eine entscheidende Rolle für die Ausbildung einer stabilen *coiled coil*-Struktur, wie durch den Einbau von 4,4,4-Trifluorsoleucin (4TFI) bzw. 5,5,5-Trifluorsoleucin (5TFI) in das Leucin-Zipper Peptid *bzip* gezeigt wurde.¹¹⁵ Bedingt durch die Anordnung der Ile-Seitenketten in den **a**- und **a'**-Positionen führt der Einbau von 5TFI in diesen Positionen zu einer deutlich stärkeren Stabilisierung (2,3 kcal/mol) als die Substitution durch 4TFI. Aufgrund des größeren Volumens der Trifluormethylgruppe wird hier die ungünstige Wechselwirkung der β -Methylgruppe mit dem Helixrückgrat verstärkt und kompensiert einen Teil des durch die höhere Hydrophobie erreichten Energiegewinns.

Eine zweite Erklärung für die Stabilisierung hydrophober Peptidstrukturen durch fluorierte Aminosäuren liefert der unter 2.1.3 beschriebene Fluoreffekt und die Aggregation fluorierter Alkylketten.^{116,117} Experimente welche diese These unterstützen sind z.B. die von Kumar *et al.* beschriebenen Versuche zur Selbstsortierung fluorierter *coiled coil*-Peptide.^{118,119} Dabei wurden zwei *coiled coil*-Peptide synthetisiert die sich lediglich in den Positionen des hydrophoben Kerns unterscheiden. Peptid **H** trägt in den Positionen **a** und **d** Leucin, während in Peptid **F** diese Positionen mit HFL besetzt sind. Die Inkubation disulfidverbrückter **HF**-Dimere zeigte nach wenigen Stunden eine deutliche Neuorientierung mit bevorzugter Ausbildung von **HH**- und **FF**-Dimeren und sinkender Konzentration der heteromeren Spezies (Abbildung 2.8). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass der Schmelzpunkt der **FF**-Dimere mit 82°C deutlich über dem der **HH**-Dimere (34 °C) sowie dem der **HF**-Heterodimere (36 °C) lag.¹¹⁸

Ein weiteres Beispiel für die Selbstaggregation fluorierter Peptide liefert der Einbau von HFL in Transmembranhelices.^{120,121} Durch den Einbau dieser fluorierten Aminosäure in die **a**- und **d**-Positionen der unpolaren Transmembrandomäne eines 29 AS Peptids konnte eine Dimerisierung der ansonsten monomer vorliegenden Helices in einer membranähnlichen Umgebung erreicht werden. Der Einbau von HFL in ein zweites Peptid, welches durch Ausbildung einer interhelikalen Wasserstoffbrücke bereits in der ursprünglichen Form als Dimer vorlag, führte ebenfalls zur Erhöhung des Oligomerisierungsgrads.

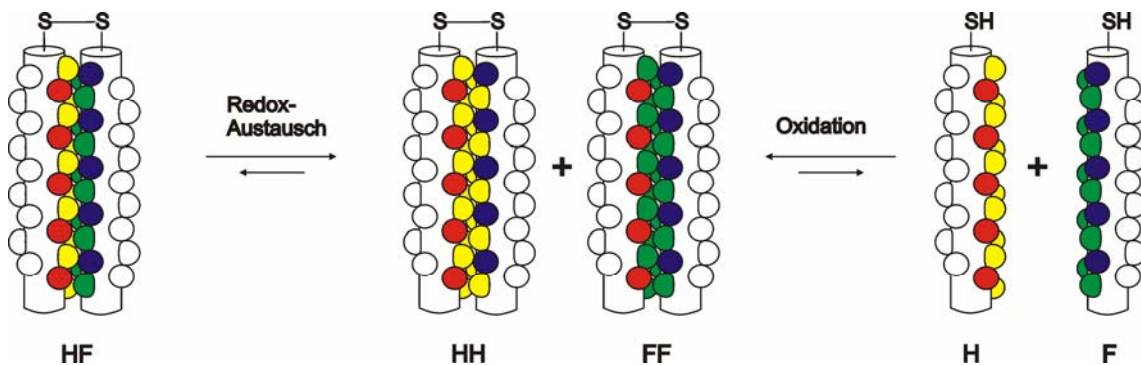


Abbildung 2.8. Selbstsortierung fluorierter *coiled coil*-Peptide. Gelb: Leucin, Grün: 5,5,5,5',5',5'-Hexafluorleucin, Blau: Lysin, Rot: Glutaminsäure. Nach Bilgiçer *et al.*¹¹⁸

Beide Experimente zeigen eindrucksvoll, dass sich durch den Einbau lipophober Aminosäuren eine Selbstaggregation von Peptiden innerhalb der hydrophoben Umgebung einer Lipidmembran induzieren lässt. Auch andere Studien unter Verwendung kleiner, globulärer Proteine haben gezeigt, dass durch den Einbau von trifluormethylsubstituierten Aminosäuren Stabilitätsgewinne erzielt werden können, die neben der höheren Hydrophobie auf eine zusätzliche Triebkraft der Stabilisierung schließen lassen.¹²²

Im Gegensatz dazu lieferten Versuche unter Verwendung antiparalleler *coiled coil*-Tetramere keine Hinweise auf die spezifische Interaktion fluorierter Aminosäuren.¹²³ Vielmehr scheint der in diesen Versuchen als Folge des Einbaus von HFL in die zentralen **a**- und **d**-Positionen der Helix-Bündel beobachtete Stabilitätsgewinn hauptsächlich auf die gegenüber Leucin erhöhte Hydrophobie von HFL zurück zu führen zu sein. Quantifiziert wurde diese über die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten ($^H\Pi$) beider Aminosäuren zwischen Wasser und Heptanol. Erwartungsgemäß zeigte dabei HFL einen deutlich höheren Wert als Leucin. Erstaunlicherweise fand sich jedoch kein Unterschied zwischen der Hydrophobie und der Fluoraffinität von Leucin und HFL ($^H\Pi_{\text{HFLLeu}} = ^F\Pi_{\text{HFLLeu}} = 1,87$). Darüberhinaus stimmten die aus dem Verteilungskoeffizienten berechneten $\Delta\Delta G$ -Werte gut mit den aus Denaturierungsexperimenten stammenden Werten für die HFL-bedingte Stabilisierung des 4-Helixbündels überein. Auch der Einbau von mehreren HFL-Resten innerhalb einer Helix ergab keine Anzeichen für die zusätzliche Stabilisierung aufgrund spezifischer Fluor-Fluor-Wechselwirkungen. Stattdessen wurde beobachtet, dass der höhere Substitutionsgrad einen geringeren Energiegewinn je HFL-Rest zur Folge hat, während unter der Annahme der Ausbildung einer separaten Fluorphase eine stärkere Stabilisierung zu erwarten gewesen wäre.¹²⁴

Als ein weiteres Indiz gegen die Theorie spezifischer Wechselwirkungen zwischen den Fluoralkylseitenketten des HFL wird von einigen Arbeitsgruppen die Beobachtung aufgeführt, dass fluorierte Lösemittel (TFE und HFIP) nicht zu einer stärkeren Denaturierung fluorsubstituierter Helices führen.¹²⁵ Aufgrund der stark helixstabilisierenden Eigenschaften dieser Lösemittel^{126,127} ist die Aussagekraft dieses Versuchs jedoch fraglich, da unter diesen Bedingungen die Isolierung der Peptide nicht zwangsläufig den Verlust der Helizität der untersuchten Peptide zur Folge hat.

Obwohl der Einbau fluorierter Aminosäuren in *coiled coil*-Peptide und 4-Helixbündel gewöhnlich zu einer Stabilisierung dieser Struktureinheiten führt, ist eine Verallgemeinerung dieses Effektes nicht möglich. Mehrere Beispiele zeigen, dass sowohl die globale Substitution einzelner Aminosäureseitenketten als auch das Einfügen eines einzigen Fluor-Atoms die Destabilisierung komplexer globulärer Proteine zur Folge haben kann. So führte beispielsweise der Austausch aller Leucin-Reste des Enzyms Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) gegen Trifluorleucin zu einer deutlichen Verringerung der thermischen und chemischen Stabilität des Enzyms.¹²⁸ Ausgehend von dieser fluorierten CAT-Variante konnte jedoch durch gerichtete Evolution¹²⁹ eine CAT-Mutante selektiert werden, deren Eigenschaften im Wesentlichen mit denen des Wildtyps vergleichbar waren bzw. diese bezüglich thermischer Stabilität und spezifischer Aktivität leicht übertrafen.¹³⁰ Hierfür wurde die durch fehleranfällige PCR erstellte CAT-Bibliothek in einen für Leucin auxotrophen *E.coil*-Stamm transformiert und die Selektion unter

Bedingungen durchgeführt, in denen Trifluorleucin die Position von Leucin innerhalb des exprimierten Peptids einnimmt. Bemerkenswerter Weise wurde dabei keiner der 13 Leucin-Reste aus dem Protein eliminiert. Vielmehr handelte es sich bei den Mutationen, die sowohl zur Erhöhung der thermischen Stabilität als auch der spezifischen Aktivität führten, um den Austausch von drei Aminosäuren, welche nicht im direkten Kontakt zu einem der Tfl-Reste stehen. Ein ähnliches Beispiel zeigt die Substitution der Leucin-Reste des grün-fluoreszierenden-Peptids (GFP) durch Trifluorleucin, in deren Folge der Verlust der Fluoreszenz des Proteins aufgrund einer fehlerhaften Faltung beobachtet wurde.¹³¹ Auch in diesem Fall konnte durch gerichtete Mutation eine fluoreszierende fluoridierte GFP-Mutante isoliert werden.

Beide Beispiele demonstrieren eindrucksvoll sowohl den destabilisierenden Effekt fluorierter Aminosäuren auf komplexe Proteinstrukturen als auch die Möglichkeit, diesen Effekt durch eine Neuorientierung der übrigen Aminosäurepositionen auszugleichen und auf diese Weise Proteine mit verbesserten Eigenschaften und einem erweiterten Aminosäurerepertoire zu generieren.

Zusammengefasst zeigen die meisten Studien eine Stabilisierung hydrophober Regionen nach dem Einbau fluorierter Aminosäuren. Viele Untersuchungen sprechen dafür, dass neben der höheren Hydrophobie der Fluoralkylseitenketten besonders die bevorzugten Fluoralkyl-Fluoralkyl-Kontakte hierbei eine wesentliche Rolle spielen. Dieser „Fluoreffekt“ könnte auch die beschriebene Fehlfaltung komplexer Proteine nach dem Austausch natürlicher hydrophober Reste gegen fluoralkylierte Aminosäuren erklären. Indem die Fluoralkylketten der nicht-natürlichen Aminosäuren während des Faltungsprozesses stärker miteinander wechselwirken als ihre natürlichen Analoga könnten sie den weiterführenden Faltungsprozess zum funktionsfähigen Protein verhindern.

Während verhältnismäßig viel über die Effekte bekannt ist, die sich durch den Einbau mehrerer fluorierter Aminosäuren in Peptide ergeben, gibt es bislang nur wenige Erkenntnisse über das Verhalten einer einzelnen fluorierten Aminosäure innerhalb einer definierten Peptidstruktur. Darüberhinaus werden eine Vielzahl der physikochemischen Eigenschaften von Fluoralkylgruppen, wie beispielsweise sterischer Anspruch, Hydrophobie und Polarität oder die Fähigkeit organisch gebundenen Fluors als Wasserstoffbrücken-Donor in der Literatur nach wie vor kontrovers diskutiert.

Verschiedene Studien an Modellpeptiden haben gezeigt, dass der Einbau einer einzelnen fluorierten Aminosäure meist zu einer Destabilisierung der untersuchten Peptidstruktur führt.^{132,133} Über die genauen Wechselwirkungsmöglichkeiten dieser Bausteine ist bisher jedoch wenig bekannt. Obwohl die wenigen hochauflösenden Strukturen von Proteinen

mit fluorierten Aminosäuren keine Veränderung in der jeweiligen Struktur erkennen lassen,¹³⁴ ist davon auszugehen, dass sich die Wechselwirkungsmöglichkeiten fluorierter Aminosäuren aufgrund der veränderten elektronischen und sterischen Eigenschaften der betroffenen Seitenkette von denen natürlicher Aminosäuren unterscheiden und für gezielte Modifizierungen auf struktureller und funktioneller Ebene einsetzen lassen.

3 Zielstellung

Fluorierte Aminosäuren stellen vielversprechende Bausteine für das Protein-Design dar. Die gezielte Modifizierung der Struktur, Stabilität und den Bindungseigenschaften von Peptiden und Proteinen durch den Einsatz fluorierter Aminosäuren erfordert jedoch detaillierte Kenntnisse über die Eigenschaften dieser Bausteine innerhalb einer natürlichen Proteinumgebung. Während sich bisherige Studien überwiegend mit den Effekten mehrfacher Fluorsubstitutionen und den daraus resultierenden Effekten auf die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von Proteinen und Modellpeptiden beschäftigt haben, fehlen systematische Untersuchungen zum Wechselwirkungsverhalten einzelner fluorierter Aminosäuren innerhalb natürlicher Proteinumgebungen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Selektionssystem entwickelt werden, welches die Identifizierung bevorzugter Wechselwirkungspartner fluorierter Aminosäuren in einer natürlichen Proteinumgebung ermöglicht. Basierend auf den Erfahrungen und Erkenntnissen aus der Arbeitsgruppe Kocsch sollte hierfür ein geeignetes *coiled coil*-Peptid als Modellsystem für eine definierte Proteinstruktur dienen. Ausgehend von einem heterodimeren *coiled coil*-Motiv sollten Peptidbibliotheken hergestellt und nach bevorzugten Bindungspartnern für die untersuchten Aminosäurebausteine durchsucht werden. Ziel war es dabei, die spezifische *coiled coil*-Wechselwirkung als Selektionskriterium zu nutzen und ein auf diesem Prinzip aufbauendes *Phage Display*-System zu entwickeln und anzuwenden.

4 Konzept

Basierend auf einem heteromeren *coiled coil* Motiv wurde ein Screeningsystem zur Identifizierung bevorzugter Wechselwirkungspartner fluorierter Aminosäuren innerhalb der *coiled coil*-Wechselwirkungsdomäne entwickelt und angewendet. Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Arbeitstechniken sollen im folgenden Kapitel kurz vorgestellt und das Prinzip des verwendeten Screeningsystems erläutert werden.

4.1 Die Herstellung und das Screening von Peptidbibliotheken

Die Grundlage für die Selektion bevorzugter Bindungspartner fluorierter Aminosäuren aus einem möglichst großen Repertoire potentieller Wechselwirkungspartner bildet eine umfangreiche Peptidbibliothek. Eine Möglichkeit zur Herstellung solcher Peptidbibliotheken besteht in der chemischen Synthese verschiedener Peptide mittels kombinatorischer Chemie. Dem Vorteil, auf diesem Wege auch nicht natürliche Aminosäuren in die Bibliothek zu integrieren, steht jedoch die Komplexität der synthetischen Arbeit gegenüber. Darüberhinaus müssen die Bindungseigenschaften jedes auf diese Weise gewonnenen Peptids einzeln bestimmt und charakterisiert werden, um den jeweils besten Bindungspartner zu ermitteln. Aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes ist die Größe der zu untersuchenden Bibliothek bei diesem Vorgehen deshalb stark limitiert.

Das Screening deutlich größerer Bibliotheken wird von einer Vielzahl molekularbiologischer Methoden ermöglicht.¹³⁵ Der Vorteil liegt hierbei in der Verknüpfung der einzelnen Bibliotheksmitglieder mit den entsprechenden Nukleinsäuren, welche diese codieren. Anhand der gesuchten Eigenschaften, z.B. der Affinität gegenüber einer bestimmten Zielstruktur, kann das gesuchte Peptid aus der Bibliothek isoliert werden. Die Verknüpfung mit dem codierenden Gen ermöglicht anschließend die Identifizierung und Amplifizierung des selektierten Peptids. Einige Strategien zur Verknüpfung des Phäno- und Genotyps von Peptidbibliotheken sind in Abbildung 4.1 skizziert.

Eine der verbreitetsten auf diesem Konzept basierenden Methoden ist die Phage Display-Technik,^{136,137} welche bevorzugt für die Selektion von Bindungswechselwirkungen eingesetzt wird und bereits erfolgreich bei der Selektion spezifischer *coiled coil*-Wechselwirkungen angewendet wurde.^{138,139} Bei dieser Technik wird das gewünschte Protein auf der Oberfläche eines Bakteriophagen präsentiert, während das entsprechende Gen zusammen mit dem Genom des Phagen im Inneren des Virus verpackt ist. Über die

Wechselwirkung des präsentierten Peptids mit der immobilisierten Zielstruktur ist es möglich, die das gesuchte Protein präsentierenden Phagen aus der Bibliothek zu isolieren. Im Anschluss werden die selektierten Phagen und damit die für das selektierte Peptid codierende DNA durch Infektion von Bakterien amplifiziert. Die Sequenzierung dieser DNA liefert schließlich die Primärstruktur des selektierten Proteins.

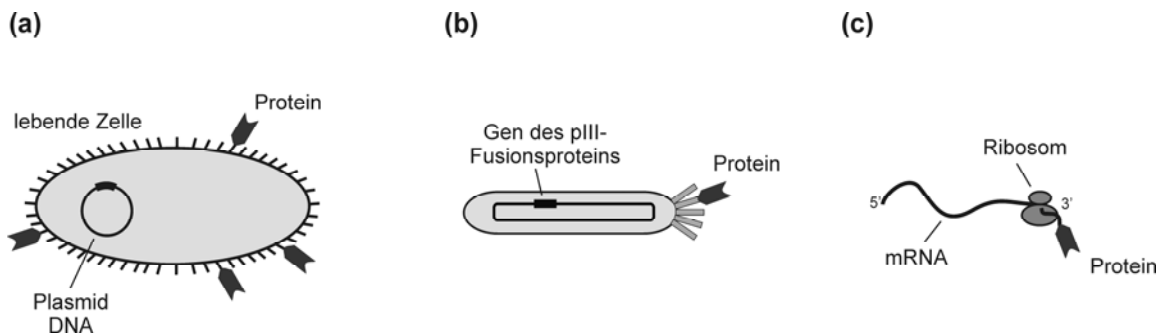


Abbildung 4.1. Auswahl einiger Strategien zur Verknüpfung von Geno- und Phänotyp bei der Erstellung von Peptidbibliotheken.¹³⁵ Beim cell surface-Display (a) wird das Protein durch Fusion an ein integrales Membranprotein auf der Oberfläche lebender Zellen präsentiert, nachdem das für das Fusionsprotein und das Membranprotein codierende Gen über ein Plasmid in die Zelle eingeschleust wurde.^{140,141} Ein ähnliches Prinzip nutzen Phage Display-Systeme (b) bei denen das Protein an einem der Hüllproteine des Phagen präsentiert und das entsprechende Gen zusammen mit dem Genom des Phagen in der Virushülle eingeschlossen ist. Eine direkte Verknüpfung von Geno- und Phänotyp besteht beim sog. Ribosomen-Display (c), bei welchem der mRNA-Ribosom-Protein-Komplex nach der Translation erhalten bleibt. Zur Identifizierung der selektierten Proteine wird der Komplex getrennt und die mRNA durch reverse Transkription in DNA umgeschrieben, welche anschließend amplifiziert und sequenziert werden kann.¹⁴²

Verschiedene Bakteriophagen, beispielsweise λ -Phagen, T4-Phagen und filamentöse Phagen stehen für diese Technik zur Verfügung. Eines der verbreitetsten Systeme, welches auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, nutzt den filamentösen Phagen M13 und soll im folgenden Abschnitt kurz vorgestellt werden.

4.1.1 Der Bakteriophage M13^{143,144}

Der Bakteriophage M13 gehört zur Ff-Klasse filamentöser Phagen (f1, fd, M13), welche spezifisch *E.coli* Bakterien infizieren, die ein F-Plasmid enthalten, wobei sie die Spitze des F-Pilus dieser Bakterien als Rezeptor für die Erkennung der Wirtszelle nutzen. Die einzelsträngige virale DNA wird im Zytoplasma der befallenen Bakterien repliziert und die Hüllproteine des Phagen werden als integrale Membranproteine synthetisiert. Durch die Verpackung der viralen DNA in die Hüllproteine werden ca. 1000 neue Phagen in der ersten Generation nach der Infektion produziert und etwa 100-200 Partikel in jeder folgenden *E.coli*-Generation, bis schließlich Phagen-Titer von 10^{11} bis 10^{12} Partikel je

Milliliter erreicht werden. Im Gegensatz zu lytischen Phagen töten Ff-Phagen während ihrer Reproduktion den Wirt nicht. Vielmehr wird dieser Prozess von den befallenen Bakterien toleriert, welche weiterhin wachsen und sich teilen, wobei jedoch die Generationszeit etwa 50% über der von nicht infizierten Bakterien liegt.

4.1.1.1 Struktur und Genom des Bakteriophagen M13

Das M13 Partikel weist bei einem Durchmesser von ca. 6,5 nm eine Länge von ca. 930 nm auf, womit es in etwa den Proportionen eines 1,2 m langen Bleistiftes entspricht.¹⁴⁴ Das Genom besteht aus einem einzelsträngigen, zirkulären DNA-Strang von ca. 6400 Nukleotiden Länge welcher im Proteinzylinder des Phagenkörpers eingeschlossen ist. Der Körper dieses Zylinders besteht aus ca. 2700 Molekülen des Haupthüllproteins pVIII (Abbildung 4.2 a). Diese 50 AS-Peptide liegen, mit Ausnahme der fünf N-terminalen Reste, als α -Helices vor und sind dachziegelartig angeordnet, wobei sie in Längsrichtung des Phagen-Zylinders rechtsgängig umeinander gewickelt sind. Dadurch wird eine sehr dichte Packung der Hüllproteine und eine hohe Beständigkeit der Viruskapsel gegenüber Proteasen erreicht. Die 10 bis 13 C-terminalen Reste der pVIII-Moleküle bilden die Innenseite des Zylinders, wobei vier positiv geladene Lysinreste innerhalb dieses Bereichs mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrates im Inneren des Virus wechselwirken.

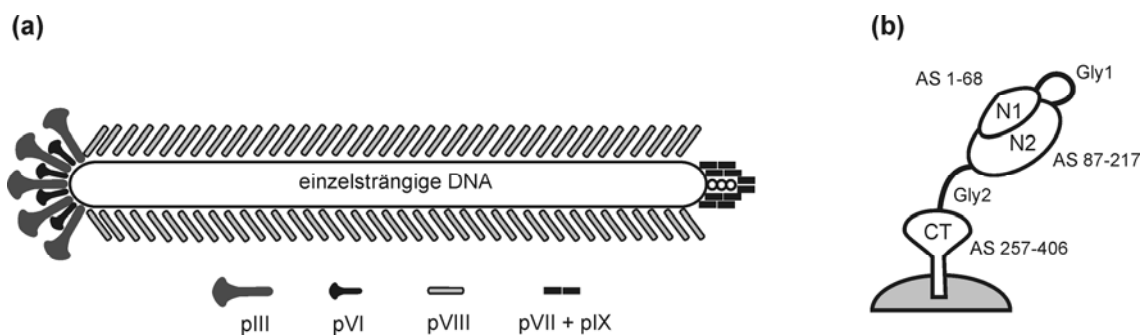
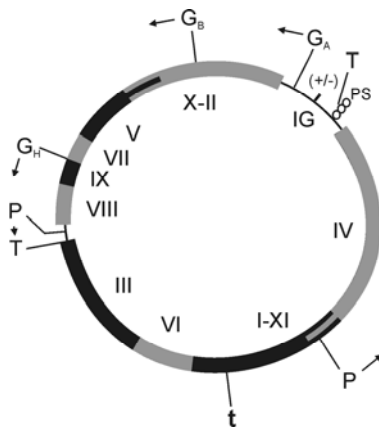


Abbildung 4.2. Schematische Darstellung des Ff-Partikels (a). Die Form der Phagenhülle resultiert aus der Überlappung der pVIII-Monomere, bei der die N-Termini der Proteine jeweils auf der Außenseite des Zylinders liegen. Dadurch ergibt sich für das Ende, das den C-Terminus trägt eine spitze und für das Ende mit dem N-Terminus eine konische Form. Es wird angenommen, dass der N-Terminus der pVIII-Moleküle während der Zusammensetzung der Partikel die Membran zuerst verlässt, wodurch die Proteine pVII und pIX am konischen Ende des Zylinders platziert werden. (b) Schematische Darstellung des Hüllproteins pIII.¹⁴³

An einem Ende des Partikels befinden sich jeweils etwa fünf Moleküle der hydrophoben Proteine pVII (33 AS) und pIX (32 AS). Darüberhinaus enthält dieses Ende das Packungssignal (PS) und wird als erster Teil des späteren Phagen zusammengesetzt. Das andere Ende des Phagen bilden jeweils fünf Moleküle der Proteine pIII und pVI, welche etwa 10-16 nm der Länge des Virus ausmachen.

Das pIII-Protein besteht aus drei Domänen, die jeweils durch Glycin-reiche Abschnitte von einander getrennt sind. Die erste Domäne, N1, besteht aus 68 AS und ist essentiell für den Infektionsprozess, die Überführung der viralen DNA in das Zytoplasma sowie den Einbau der Hüllproteine in die Zellmembran. N2, die zweite Domäne, ist für die Bindung an den F-Pilus notwendig und wird von den AS 87-217 gebildet. Beide Domänen werden an der Oberfläche des Phagen präsentiert, wo sie miteinander interagieren und eine hufeisenähnliche Struktur ausbilden. Die C-terminalen 150 AS bilden die dritte Domäne (CT) des pIII-Moleküls und sind für die Ausbildung stabiler Phagen-Partikel erforderlich (Abbildung 4.2. b).

Das Genom der Fφ-Phagen (M13, f1 und fd) codiert jeweils für 11 Proteine (Abbildung 4.3), wobei die Gene entsprechend ihrer Funktion im Lebenszyklus des Phagen angeordnet vorliegen. Die Gene II, V und X codieren die Proteine, welche für die Replikation des Phagen-Genoms notwendig sind. Die zweite Gruppe enthält die Gene der Hüllproteine des Virus (pVII, pIX, pVIII, pIII und pVI). In der dritten Gruppe finden sich schließlich die Gene der Proteine pI, pXI und pIV die am Zusammenbau der Viruspartikel beteiligt sind.



Gen	Funktion des Genproduktes
II	DNA-Replikation
X	DNA-Replikation
V	Bindung einzelsträngiger DNA
VIII	Hüllprotein
III	Hüllprotein
VI	Hüllprotein
VII	Hüllprotein
IX	Hüllprotein
I	Zusammensetzung der Virushülle
IV	Zusammensetzung der Virushülle
XI	Zusammensetzung der Virushülle

Abbildung 4.3. Darstellung des Genoms des Bakteriophagen M13 mit den relativen Positionen der einzelnen Gene sowie den wichtigen Promotoren und Terminatoren. **T**: Terminator; **t**: schwacher Terminator; **G_A**, **G_B**, **G_H**: Promotoren für die Transkription der Gene II-VIII; **P**: Promotoren für die Transkription der Gene II,VI,I-XI, IV; **PS**: Packungssignal; **(+/-)**: Replikationsursprung des viralen (+) und des komplementären (-) DNA-Strangs, **IG**: intergenic region.¹⁴³

Die Proteine pX und pXI entstehen jeweils durch den Start der Translation an einem internen Start-Codon in den Genen II und I. Da sich diese Codons ebenfalls im Leseraster

befinden, entsprechen pX und pXI jeweils dem C-terminalen Bereich von pII und pI. Darüberhinaus beinhaltet das Genom eine kurze Sequenz (sog. *intergenic region*) welche nicht für Proteine codiert und das Packungssignal (PS) sowie den Replikationsursprung (*ori*) für die Synthese der viralen (+) und der komplementären (-) DNA enthält.

Zwei starke Transkriptions-Terminatoren teilen das Genom in zwei unterschiedlich transkribierte Regionen (Gene II bis VIII, sowie III bis IV). Die Transkription der häufig transkribierten Gene (II-VIII) startet an den Promotoren G_A, G_B und G_H und endet am Terminator nach Gen VIII. Der Hauptpromotor für die weniger häufig transkribierten Gene (III, VI, I-XI, IV) befindet sich direkt vor den Genen III und IV. Durch einen schwachen Terminator am Ende von Gen I-XI wird hauptsächlich m-RNA synthetisiert, die die Gene III und VI enthält, da die Wirtszelle aufgrund der kanalbildenden Eigenschaften von pI nur geringe Mengen dieses Proteins toleriert. Die Synthese ausreichender Mengen pIV-mRNA wird durch einen Promoter am Ende von Gen I/XI gewährleistet.

Bedingt durch die wenigen nicht codierenden Bereiche werden Kassetten für die Resistenz gegenüber Antibiotika gewöhnlich in der *intergenic region*, bzw. in dem Bereich zwischen den Genen VIII und III eingefügt.

4.1.1.2 Lebenszyklus des Bakteriophagen M13

Der Lebenszyklus eines F-Pilus spezifischen Phagen ist schematisch in Abbildung 4.4 dargestellt. Die Infektion beginnt mit der Bindung von pIII an den F-Pilus des *E.coli* Bakteriums. Durch das Zurückziehen des Pilus wird anschließend das Virus in die Nähe der Membranoberfläche gebracht, wodurch die N1-Domäne des pIII-Proteins, die nach Bindung von N2 an den F-Pilus zugänglich wird, an das Membranprotein TolA binden kann. In der Folge kommt es zum Zerfall der Virushülle, wobei die Hüllproteine in der Zytoplasmamembran der Wirtszelle eingelagert werden und die DNA in das Zytoplasma gelangt. Im Zytoplasma wird die Virus-DNA durch Enzyme des Bakteriums in doppelsträngige DNA überführt, welche schließlich kovalent geschlossen und superspiralisiert vorliegt. Der (-) Strang bildet das Templat für die m-RNA, deren Translation die einzelnen Phagen-Proteine liefert.

Wie die Hüllproteine, werden auch die am Aufbau der Phagen-Partikel beteiligten Proteine pI, pIV und pXI nach ihrer Synthese in die Zellmembran integriert. Dabei lagern sich ca. 12 bis 14 pIV-Moleküle zusammen und werden in die äußere Membran eingelagert, wobei jeweils der N-terminale Bereich im periplasmatischen Raum verbleibt. Von den Proteinen pI und pXI wird angenommen, dass sie gemeinsam einen Kanal durch die Zytoplasmamembran bilden, welcher mit dem pIV-Komplex in der äußeren Membran

wechselwirkt und mit diesem während der Zusammensetzung der Virus-Partikel einen Kanal durch beide Membranen bildet. Das Protein pV sowie die Proteine pII und pX, welche die Replikation der viralen DNA steuern, verbleiben als einzige Phagenproteine nach ihrer Synthese im Zytoplasma.

Nach dem Erreichen einer bestimmten Konzentration an pV-Molekülen umhüllen diese die neu synthetisierten Einzelstränge der viralen DNA und verhindern deren Umwandlung in doppelsträngige DNA. Die 78 Nukleotide des Packungssignals werden dabei nicht von pV-Molekülen umhüllt und leiten schließlich die Zusammensetzung der neuen Viren ein.

An der Initiation der Zusammensetzung sind jeweils etwa fünf Moleküle pVII und pIX beteiligt, die gemeinsam mit den ersten pVIII-Molekülen mit dem Packungssignal der DNA wechselwirken und das Ende der Virushülle bilden. Nach der Initiation wird das Virus schrittweise verlängert, indem die pV-Moleküle gegen pVIII-Hüllproteine ausgetauscht werden und das Virus über die Pore aus pIV-Molekülen durch die Membran geschleust wird. Die positiv geladenen C-Termini der pVIII-Moleküle wechselwirken dabei mit dem Phosphatrückgrat der DNA während die in der Membran eingelagerten Abschnitte die Virushülle bilden. Sobald das Ende der DNA erreicht ist, wird der Vorgang beendet, indem jeweils etwa fünf pVI- und pIII-Moleküle eingebaut werden, welche das Ende der Virushülle bilden.

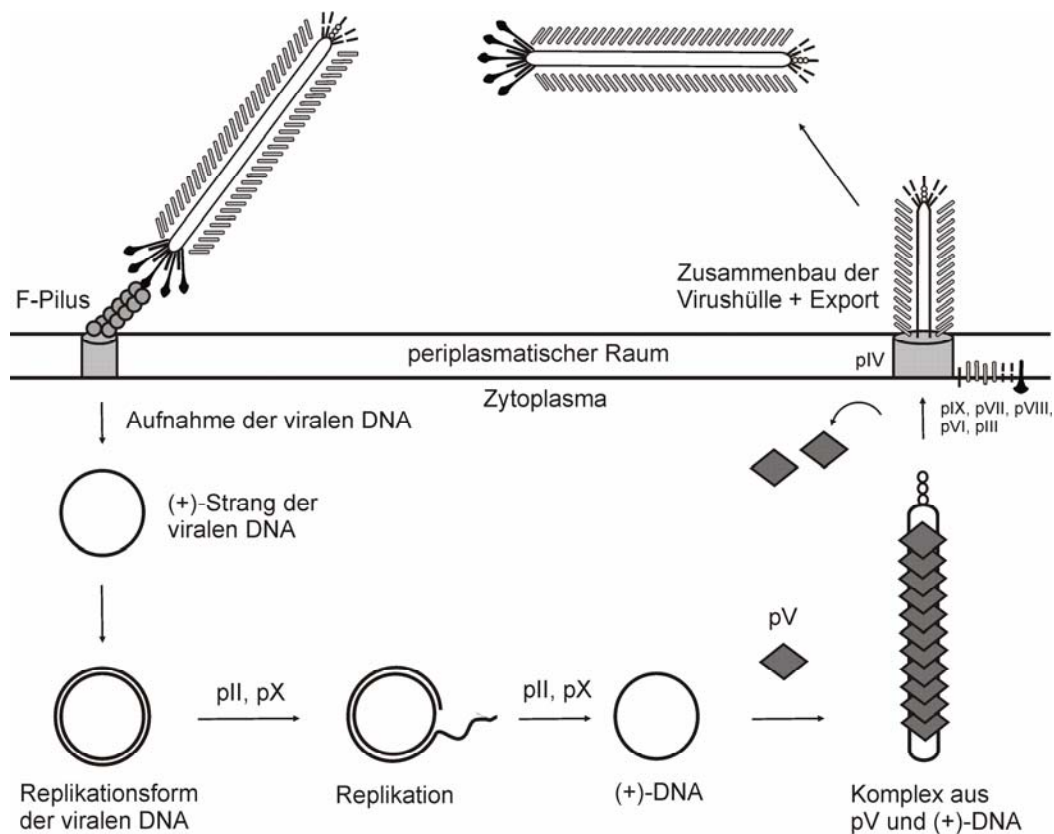


Abbildung 4.4. Schematische Darstellung des M13-Lebenszyklus, nach Kay et. al.¹⁴⁴

4.1.2 Präsentation von Peptiden und Proteinen an der Oberfläche von M13

Die Anordnung der verschiedenen Hüllproteine während der Zusammensetzung der Viruspartikel wird in erster Linie durch die hydrophoben Transmembranregionen der Proteine gesteuert und erlaubt auch den Einbau chimärer Hüllproteine in die Viruspartikel. Theoretisch kann dabei jedes beliebige Peptid an die periplasmatische Region der Hüllproteine fusioniert werden, vorausgesetzt es kann durch die innere Zellmembran transportiert werden und interferiert nicht mit dem Aufbau der Virushülle.

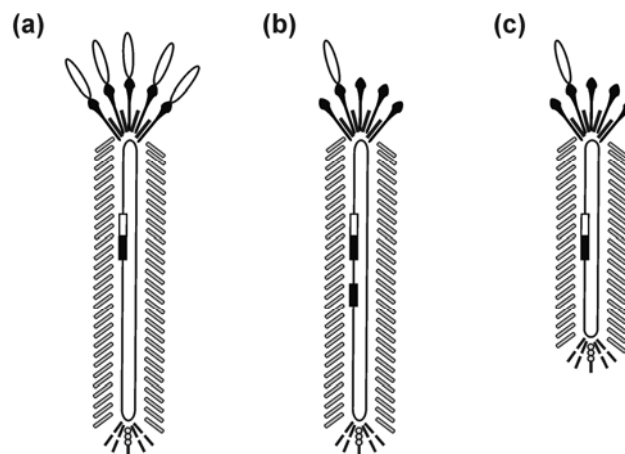


Abbildung 4.5. Allgemeine Phage Display-Strategien. Phagen Systeme (a) enthalten nur eine Genkopie (schwarz) des Hüllproteins an welches die Sequenz des Fremd-Proteins (weiß) fusioniert wird. Dadurch tragen alle Kopien des Hüllproteins im Virus-Partikel das fremde Protein. In sog. Hybrid-Systemen (b) wird meist nur eine Kopie des Fusionsproteins präsentiert, da das Genom zusätzlich zu dem Gen der Chimäre das (stärker exprimierte) Wildtyp-Gen enthält. In phagemid-Systemen (c) enthält das Virus statt des Phagen-Genoms das (kleinere) phagemid. Beim Aufbau der Viruspartikel werden sowohl die von den Helferphagen codierten Wildtyp-Proteine als auch die im phagemid codierten Fusionsproteine verwendet (nach Kay et al.¹⁴⁴).

Obwohl prinzipiell alle Hüllproteine für die Präsentation fremder Proteine an der Oberfläche filamentöser Phagen in Frage kommen, werden diese gewöhnlich an den N-Terminus der Hüllproteine pVIII oder pIII fusioniert. Dabei können größere Proteine ausschließlich als pIII-Chimäre präsentiert werden, da von dem Virus nur VIII-Chimäre akzeptiert werden deren Fusionspeptid aus maximal 4-6 AS besteht.

Gegenwärtig stehen drei Systeme zur Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche von M13 zur Verfügung (Abbildung 4.5). Im einfachsten Fall wird das fusionierte Protein an jeder Kopie des gewählten Hüllproteins (pVIII bzw. pIII) präsentiert, indem die entsprechende DNA mit dem einzigen Gen des Proteins im Genom des Phagen fusioniert wird. Für pVIII hätte dies zur Folge, dass jede der ca. 2700 Kopien des Hüllproteins die neue Peptidsequenz trägt, wodurch die Größe des Peptids erheblich limitiert wird.

Günstiger ist daher die Herstellung von pIII-Chimären, da jedes Virus jeweils nur etwa fünf Kopien dieses Proteins enthält. Darüberhinaus erlaubt der Einbau am Ende des Virus die Fusion deutlich größerer Proteine aufgrund der geringeren sterischen Hinderung bei der Passage der pIV-Austrittspore. Allerdings besteht hier die Einschränkung darin, dass das fusionierte Protein die Infektiosität des Virus nicht beeinträchtigen darf, da durch den herrschenden Selektionsdruck bereits geringe Störungen bei der Zusammensetzung der Phagen-Partikel oder dem Infektionsprozess zur Anreicherung des nicht modifizierten Wildtyps in der Bibliothek führen würde. Dieses Problem lässt sich durch sogenannte Hybrid-Systeme verhindern, bei denen jeweils nur wenige bzw. nur eine einzige Kopie des chimären Hüllproteins in das Virus eingebaut wird. Dies lässt sich zum einen dadurch realisieren, dass das Virengenom zwei Kopien des entsprechenden Gens enthält, von denen nur eine die DNA des Fusionsproteins enthält. Durch gezieltes Design der Promotoren wird erreicht, dass das Wildtyp-Protein stärker exprimiert und in der Folge häufiger in die Virenhülle eingebaut wird als das Fusionsprotein.

Eine andere Möglichkeit besteht in der Verwendung sog. *phagemid*-Systeme. Dabei handelt es sich um ein Plasmid, welches neben dem Gen des Fusionsproteins und dem Packungssignal ein Antibiotikaresistenzgen sowie einen viralen und einen bakteriellen Replikationsursprung trägt. Nach Transformation in *E.coli*-Bakterien kann das *phagemid* wie ein normales Plasmid amplifiziert und isoliert werden. Durch Infektion der das *phagemid* tragenden Bakterien mit sog. Helferphagen wird die Synthese des auf dem *phagemid* codierten Fusionsproteins initiiert, sowie der virale Replikationsursprung aktiviert und einzelsträngige *phagemid*-DNA synthetisiert. Gleichzeitig steuert das Genom der Helferphagen die Synthese aller Wildtyp-Phagenproteine, welche zusammen mit dem von der *phagemid*-DNA codierten Fusionsprotein die Bausteine für die neuen Viruspartikel darstellen. Durch die Verwendung von Helferphagen mit defektem Packungssignal wird bei der Zusammensetzung der Virenhülle hauptsächlich die einzelsträngige *phagemid*-DNA verpackt, wobei neben den zahlreicher vorhandenen Wildtyp-Proteinen auch geringe Mengen des Fusionsproteins eingebaut werden. Mit Hilfe der auf dem *phagemid* codierten Antibiotikaresistenz können *E.coli*-Bakterien nach erfolgreicher Infektion mit den *phagemid*-Phagen isoliert werden. Die Kultivierung dieser Bakterien und Superinfektion mit Helferphagen erlaubt anschließend die Amplifizierung der *phagemid*-Phagen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich das Hybrid-pIII-Display angewendet, welches im folgenden Unterkapitel kurz vorgestellt werden soll.

4.1.2.1 *Phagemid*-Display am Hüllprotein pIII

Da auch bei Verwendung der Hybrid-Strategie die Größe des fusionierten Peptids beim pVIII-Display begrenzt ist, stellt pIII das am häufigsten verwendete Hüllprotein für die Präsentation von Proteinen auf M13 dar. Im einfachsten Fall wird dabei das fremde Protein vor der ersten Domäne von pIII (N1) eingefügt wodurch es sich am äußersten Ende des Viruspartikels befindet und die Passage durch die Austrittspore am wenigsten behindert. Bei der Verwendung von *phagemid*-Vektoren muss allerdings beachtet werden, dass die N-terminalen Domänen der pIII-Proteine zur Immunisierung der infizierten Bakterien führen und eine Superinfektion mit anderen filamentösen Phagen verhindern. Aus diesem Grund wird das chimäre pIII-Protein in der *phagemid*-DNA häufig ohne die N1- und N2-Domäne codiert.

Für das in dieser Arbeit durchgeführte pIII-Display wurde der *phagemid*-Vektor pComb3H¹⁴⁵, eine Variante des Vektors pComb3¹⁴⁶, verwendet. Dieser Vektor enthält das Gen für die Aminosäuren 230-406 des pIII-Proteins, welche der C-terminalen Domäne CT sowie dem größten Teil des Glycin-reichen Verbindungsstücks zu N1 entsprechen. Über eine Sfi I-Schnittstelle wird die DNA des Fremdproteins an das 5'-Ende dieses Gens eingefügt. Das so erhaltene Fusionsprotein wird durch einen schwachen Promotor nur in geringem Umfang exprimiert. Dadurch werden mögliche toxische Effekte des Fusionsproteins minimiert und überwiegend voll infektiöse *phagemid*-Phagen synthetisiert.

4.2 Das *coiled coil*-Faltungsmotiv als Modellsystem

Entscheidend für die Untersuchung spezifischer Wechselwirkungen fluorierter Aminosäuren in einer natürlichen Proteinumgebung ist die Wahl eines geeigneten Modellsystems. Das verwendete Modellpeptid sollte leicht handhabbar und einfach zu synthetisieren sein, sowie den Einbau unterschiedlicher nicht-natürlicher Aminosäuren erlauben. Darüberhinaus sollte es über eine definierte Struktur mit spezifischen Wechselwirkungsdomänen verfügen. Innerhalb dieser Domänen sollte das Modellpeptid Substitutionspositionen für die fluorierten Aminosäuren aufweisen, deren direkt wechselwirkende Positionen innerhalb der Strukturdomäne genau definiert sind. Außerdem muss die dreidimensionale Struktur des Modellpeptids über eine ausreichende Stabilität verfügen, um der Substitution einer einzelnen Aminosäureposition zu widerstehen und gleichzeitig sensitiv genug sein, um die aus dieser Veränderung resultierenden Effekte zu detektieren.

Ein Faltungsmotiv, welches diese Anforderungen erfüllt, stellt das α -helikale *coiled coil* dar, das zu den am weitesten verbreiteten und am besten untersuchten Proteinfaltungsmotiven zählt. Die dem Motiv zugrunde liegenden Strukturprinzipien sind dank intensiver Forschungsarbeit gut verstanden und in zahlreichen Übersichtsartikeln zusammengefasst.^{147,148,149}

Schätzungsweise 3-5% aller Aminosäuren in natürlich vorkommenden Proteinen sind an der Ausbildung von *coiled coil*-Strukturen beteiligt. Entsprechend vielfältig sind die biologischen Funktionen der unterschiedlichen Proteine, in denen das *coiled coil*-Motiv zu finden ist. Strukturproteine wie das α -Keratin¹⁵⁰, virale Fusionsproteine wie das gp41^{151,152} des HIV oder DNA-Bindungsmotive wie GCN4¹⁵³ sind nur einige Beispiele und verdeutlichen die biologische Bedeutung dieses Strukturmotivs.

4.2.1 Struktur und Designprinzipien des α -helikalen *coiled coil*

Gewöhnlich besteht das α -helikale *coiled coil* aus zwei bis fünf α -Helices welche umeinander gewunden angeordnet und linksgängig superspiralisiert sind (Abbildung 4.6). Die Primärstruktur der einzelnen Helices besteht aus einer periodischen Abfolge von jeweils sieben Aminosäuren [(a-b-c-d-e-f-g)_n], welche als *heptad repeat* bezeichnet wird (Abbildung 4.7).¹⁴⁹

In den Positionen **a** und **d** finden sich typischer Weise Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten (überwiegend Leu, Ile, Val). Diese bilden eine hydrophobe Grenzfläche zwischen den Helices und stellen die entscheidende Triebkraft für die Interaktion der Helices dar. Darüberhinaus hat die Besetzung dieser Positionen mit β - oder γ -verzweigten hydrophoben Aminosäuren Einfluss auf die Spezifität und Oligomerisierung der *coiled coil*-Strukturen. Die Positionen **e** und **g** hingegen sind häufig mit geladenen Aminosäuren besetzt, die durch die Ausbildung interhelikaler Salzbrücken zu einer zusätzlichen Stabilisierung des *coiled coil* führen und einen entscheidenden Einfluss auf die Orientierung der Helices zueinander haben sowie ausschlaggebend für eine homo- oder heterotypische *coiled coil*-Bildung sind.¹⁴⁹

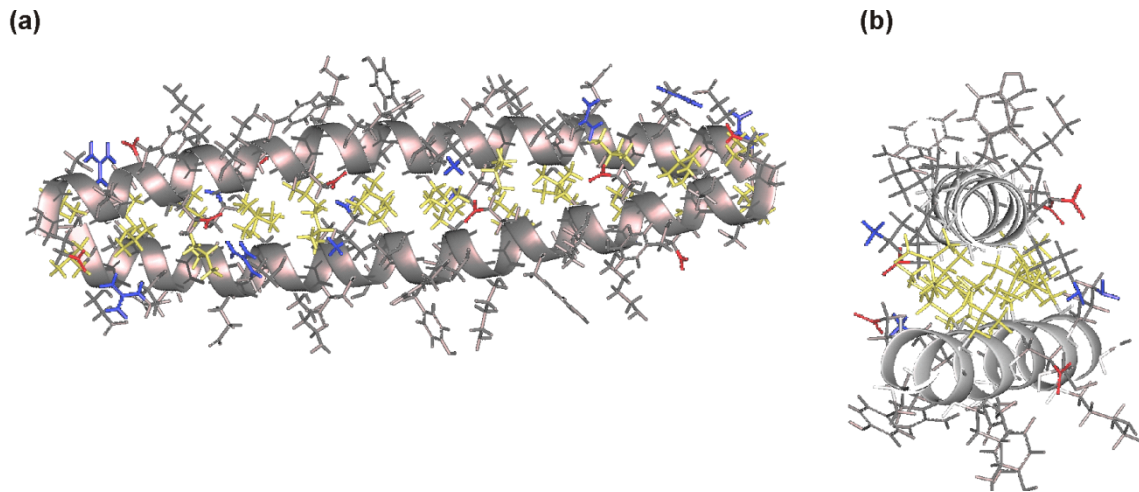


Abbildung 4.6. Molecular modelling-Struktur eines antiparallelen coiled coil in der Seitenansicht (a) und entlang der Helixachse (b) betrachtet. Die hydrophoben Aminosäuren in den Positionen **a** und **d** sind in gelb dargestellt, die geladenen Aminosäureseitenketten der **e**- und **g**-Positionen in blau bzw. rot.¹⁵⁴

Die übrigen Positionen des *heptad repeat* (**b**, **c** und **f**) sind in *coiled coil*-Dimeren zum Lösungsmittel orientiert und nehmen nicht an der Wechselwirkungen zwischen den Helices teil. In diesen Positionen finden sich bevorzugt polare Aminosäuren, welche die Löslichkeit der Peptide verbessern und durch die Ausbildung intrahelikaler Salzbrücken zu einer weiteren Stabilisierung der Konformation führen können.

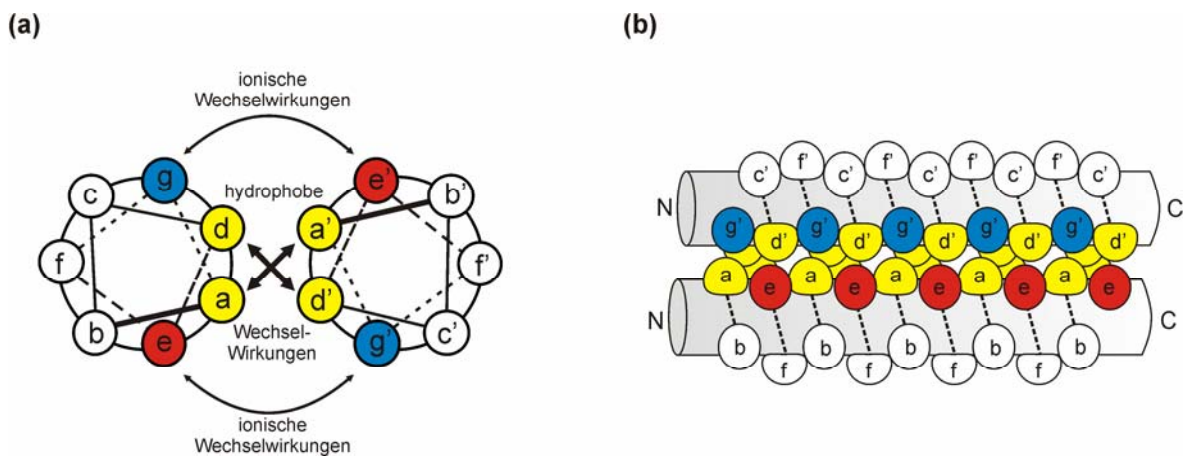


Abbildung 4.7. Schematische Darstellung eines parallelen α -helikalen coiled coil als helical wheel (a) sowie in der Seitenansicht. Der hydrophobe Kern ist in gelb, die elektrostatische Erkennungsdomäne in rot bzw. blau dargestellt.

4.3 Das *coiled coil*-basierte Screeningsystem

Die unterschiedlichen Wechselwirkungsdomänen machen das *coiled coil*-Motiv zu einem idealen Modellsystem für die Untersuchung nicht-natürlicher Aminosäuren in einer natürlichen Proteinumgebung. Bedingt durch die eindeutige Signatur der helikalen *coiled coil*-Struktur sind konformative Änderungen als Folge des Einbaus fluorierter Aminosäuren mittels CD-Spektroskopie leicht zu verfolgen.¹⁵⁵ Während die Substitution einer **a**- oder **d**-Position Informationen über das Verhalten in einer hydrophoben Umgebung liefert, lässt sich durch den Einbau einer fluorierten Aminosäure in einer **e**- bzw. **g**-Position deren Einfluss in einer polaren Umgebung untersuchen.

Ausgehend von einem heteromeren *coiled coil*-Dimer sollte im Rahmen dieser Arbeit ein *Phage Display* basiertes Screeningsystem entwickelt werden, welches die Bestimmung bevorzugter Wechselwirkungspartner fluoralkylsubstituierter Aminosäuren aus dem Pool der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren erlaubt.

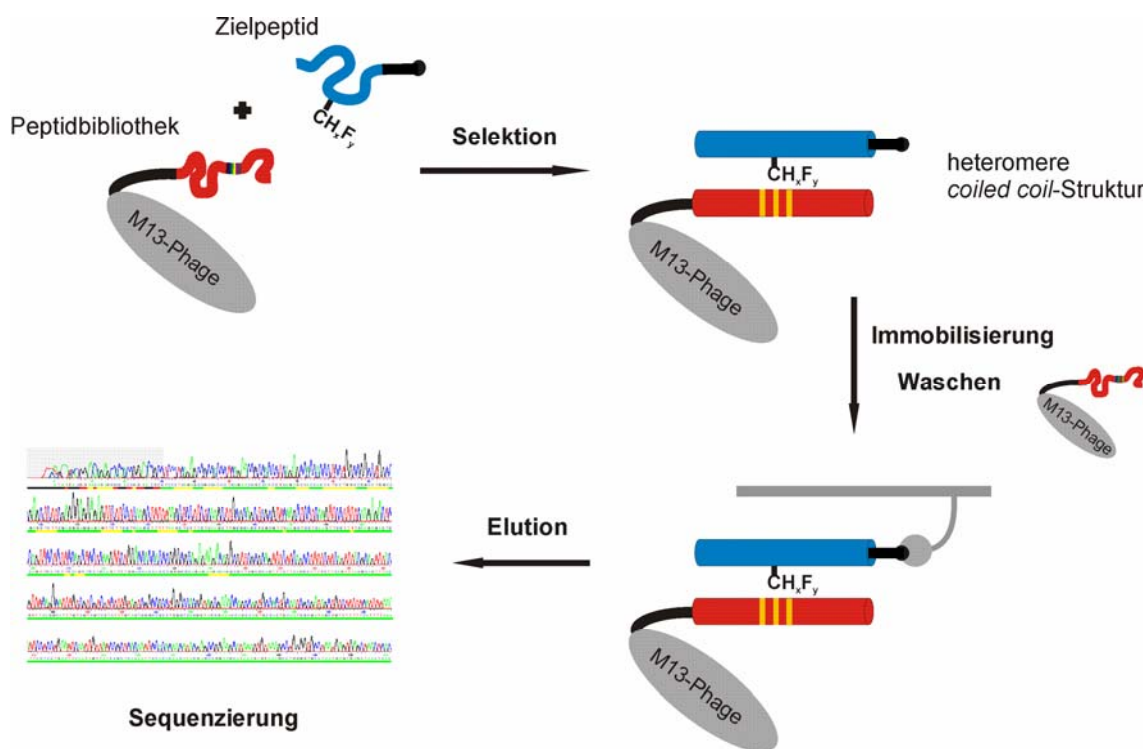


Abbildung 4.8. Schematische Darstellung der *coiled coil*-basierten Selektionsstrategie zur Bestimmung spezifischer Wechselwirkungspartner fluoralkylsubstituierter Aminosäuren.

Das diesem Screeningsystem zugrunde liegende Konzept ist in Abbildung 4.8 schematisch dargestellt. In einem der beiden Peptidstränge des heteromeren *coiled coil*-Dimers wird eine Aminosäure innerhalb der Erkennungsdomäne durch eine fluorierte Aminosäure substituiert, während im gegenüberliegenden Peptidstrang die mit dieser Aminosäure

wechselwirkenden Positionen randomisiert werden. Nach Präsentation der Peptidbibliothek an der Oberfläche von Bakteriophagen werden anschließend unter Ausnutzung der spezifischen *coiled coil*-Wechselwirkung die Mitglieder der Peptidbibliothek selektiert, welche mit dem fluorierten Peptidstrang stabile *coiled coil*-Dimere ausbilden. Durch Immobilisierung des Zielpeptids über ein kovalent gebundenes Ankermolekül an einer geeigneten Oberfläche ist es anschließend möglich, alle nicht gebundenen Mitglieder der Peptidbibliothek zu entfernen. Die selektierten Phagen werden daraufhin vom Trägermaterial gelöst und die Primärstruktur der an der Phagenoberfläche präsentierten Peptide durch Sequenzierung der entsprechenden Abschnitte im Genom der Bakteriophagen ermittelt.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Entwicklung des *coiled coil*-basierten Screeningsystems

5.1.1 *Coiled coil*-Design

Die Grundlage des Phage Display-basierten Screeningsystems bildet ein paralleles *coiled coil*-Heterodimer, welches für den Erfolg der unter Punkt 4.3 beschriebenen Screeningstrategie verschiedene strukturelle Eigenschaften erfüllen muss. Zum einen benötigen die Dimere eine ausreichende Stabilität um die erfolgreiche Selektion auf Basis der *coiled coil*-Wechselwirkungen zwischen beiden Komponenten zu gewährleisten. Zum anderen wird eine hohe Spezifität der Heteromerbildung verlangt, da eine starke Homodimerbildung mit den für die Selektion notwendigen Heterodimeren konkurrieren und eine Bindung zwischen dem an der Phagenoberfläche präsentierten *coiled coil*-Strang mit dem immobilisierten Zielpeptid ggf. verhindert werden würde.

Der Einfluss der verschiedenen natürlichen Aminosäuren in den einzelnen Positionen des *heptad repeat* auf die Orientierung und die Oligomerisierung von *coiled coil*-Peptiden ist intensiv untersucht und gut verstanden.¹⁴⁹ Auf Grundlage dieser Informationen wurde ein den gestellten Anforderungen entsprechendes *coiled coil*-Motiv entwickelt. In Anlehnung an die Struktur des natürlichen *coiled coil*-Dimers GCN4 wurde eine parallele Orientierung für das verwendete System gewählt. Die Primärstruktur der Modellpeptide VPK und VPE, deren Design von einem von Hodges *et al.* beschriebenen parallelen Heterodimer abgeleitet wurde,¹⁵⁶ ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Für die Besetzung der **a**-Positionen wurde in beiden Peptiden Valin gewählt, da diese Aminosäure in den **a**-Positionen paralleler *coiled coil*-Peptide besonders häufig zu finden ist und bevorzugt in Dimeren auftritt.¹⁴⁹ Leucin stellt die am häufigsten innerhalb des hydrophoben Kerns zu findende Aminosäure dar und wurde für die Besetzung der **d**-Positionen gewählt.¹⁵⁷

Die Ausbildung von Heterodimeren sollte durch den Einbau der positiv geladenen Aminosäure Lysin in den **e**- und **g**-Positionen des Peptids VPK, bzw. der negativ geladenen Glutaminsäure in Peptid VPE erreicht werden.¹⁵⁸ Ausgehend von dieser Aminosäureverteilung ergeben sich bei der Ausbildung einer heteromeren *coiled coil*-Struktur elektrostatisch anziehende **e-g'** und **g-e'** Wechselwirkungen, welche im Fall von homomeren VPE- bzw. VPK-Dimeren abstoßend wirken und die Ausbildung von Heterodimeren begünstigen. Durch den Austausch von Lysin/Glutaminsäure gegen Glutaminsäure/Lysin in den Positionen g₂₂ und e₂₇ bzw. g'₂₂ und e'₂₇ wurde zusätzlich die parallele Anordnung der beiden Peptide forciert, da nur diese Orientierung ein Maximum an anziehenden elektrostatischen Wechselwirkungen ermöglicht. Zur Vermeidung

intrahelikaler elektrostatischer Abstoßungen wurden für die Positionen **a** und **b** alternierend Alanin und Serin verwendet, wobei Alanin als helixinduzierende Aminosäure die Stabilität der *coiled coil*-Struktur erhöhen und die polare Seitenkette des Serins die Löslichkeit der Peptide verbessern sollte.^{159,160} Die **f**-Positionen wurden in VPK mit Glutaminsäure und in VPE mit Lysin besetzt, um die Nettoladung beider Peptide (bei neutralem pH) zu reduzieren.

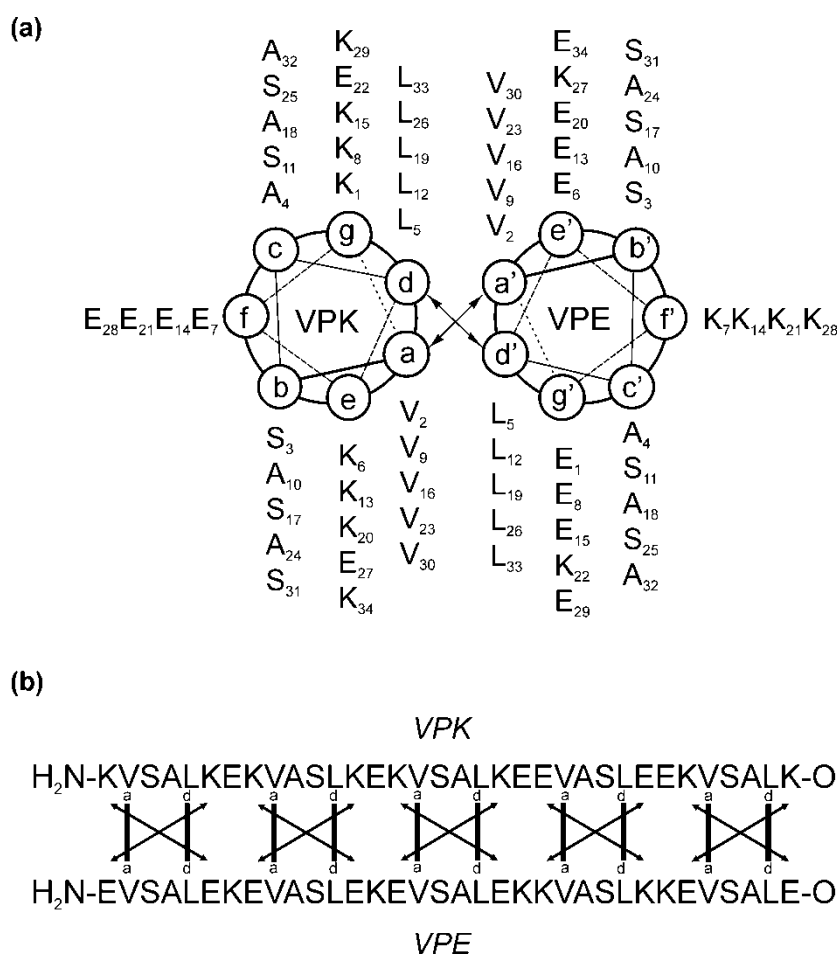


Abbildung 5.1. Helical wheel-Diagramm (a) und Aminosäuresequenz (b) der Peptide VPK und VPE.

5.1.2 Überprüfung des Designs

Bevor die Modellpeptide VPK und VPE für weitere Versuche genutzt werden konnten, musste zunächst das Design der heteromeren *coiled coil*-Struktur überprüft werden. Hierfür wurden beide Peptide einzeln sowie im Gemisch CD-spektroskopisch untersucht, um Information über die Spezifität und Stabilität der jeweils gebildeten *coiled coil*-Strukturen zu erhalten (Abbildung 5.2).

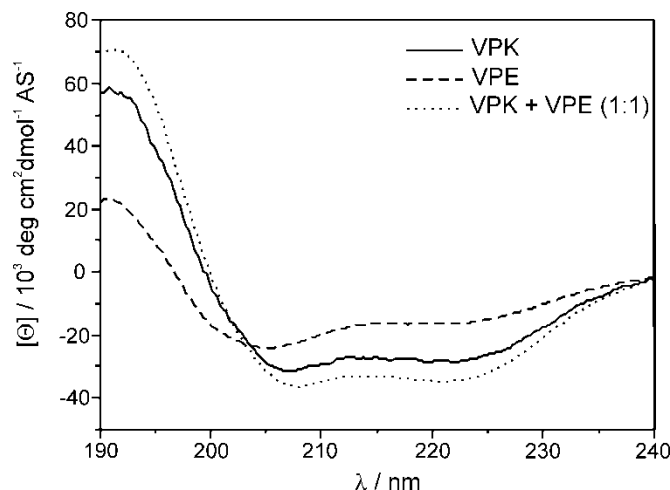


Abbildung 5.2. CD-Spektren der Peptide VPK, VPE, sowie einer äquimolaren Mischung beider Peptide. Die Spektren wurden jeweils bei 20 °C in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und einer Gesamtpeptidkonzentration von 20 μ M aufgenommen.

Entsprechend dem Design zeigt das äquimolare Gemisch beider Peptide das für eine α -Helix charakteristische CD-Spektrum, welches sich durch zwei ausgeprägte Minima bei 208 nm und 222 nm auszeichnet.¹⁶¹ Das Einzelspektrum von VPK zeigt ebenfalls die helixtypische Signatur, während im CD-Spektrum von VPE das schwach ausgeprägte Minimum bei 222 nm sowie das stark ausgeprägte Minimum bei 205 nm auf einen deutlich geringeren Helixanteil schließen lassen.

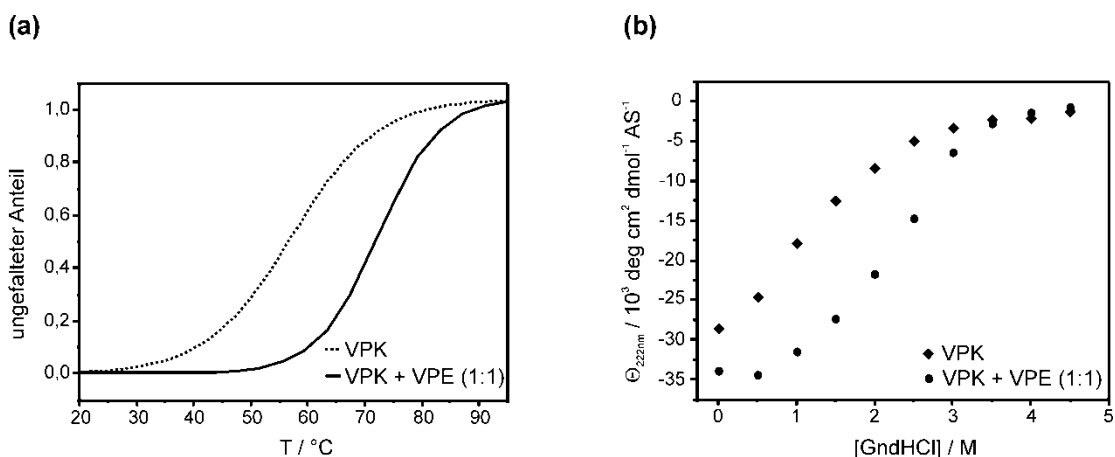


Abbildung 5.3. Darstellung der thermischen (a) und chemischen Denaturierung (b) von VPK bzw. dem äquimolaren Gemisch von VPK und VPE. Beide Experimente wurden in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bei einer Gesamtpeptidkonzentration von 20 μ M durchgeführt. Die Temperatur während der chemischen Denaturierung mit GndHCl betrug 20°C. Die dargestellten Kurven der thermischen Denaturierung wurden aus den Rohdaten wie unter 7.2.3 beschrieben gefittet.

Zur Abschätzung der Stabilität sowohl der heteromeren VPK/VPE-, als auch der homomeren VPK-Strukturen, wurden temperaturabhängige CD-Spektren aufgenommen. Dabei wurde die Intensität des Signals bei 222 nm beobachtet und über die Abnahme dieses Minimums die Denaturierung der helikalen Struktur verfolgt. Der Verlauf der beiden erhaltenen Schmelzkurven sowie die daraus ermittelten Schmelzpunkte zeigen deutliche Unterschiede zwischen den beiden *coiled coil*-Strukturen (Abbildung 5.3 a), wobei das von VPK und VPE gebildete Heteromer mit einem Schmelzpunkt von 72,4 °C eine deutlich höhere Stabilität aufweist als die VPK-Homomere ($T_m = 56,3$ °C).

Die Auftragung der bei unterschiedlichen Konzentrationen GndHCl gemessenen Elliptizität bei 222 nm zeigt ebenfalls jeweils einen sigmoidalen Verlauf mit einem einzelnen Wendepunkt und bestätigt die höhere Stabilität der VPK/VPE-Heteromere (Abbildung 5.3 b). Obwohl bei pH 7,4 sowohl das VPK/VPE-Gemisch, als auch VPK allein α -helikale *coiled coil*-Strukturen ausbilden, konnte mittels thermischer und chemischer Denaturierung gezeigt werden, dass sich beide Strukturen deutlich in ihrer Stabilität unterscheiden. Aufgrund der höheren Stabilität der VPK/VPE-Dimere kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die Ausbildung von VPK-Homomeren nicht mit der für die Selektion benötigten VPK/VPE-Dimerisierung konkurriert.

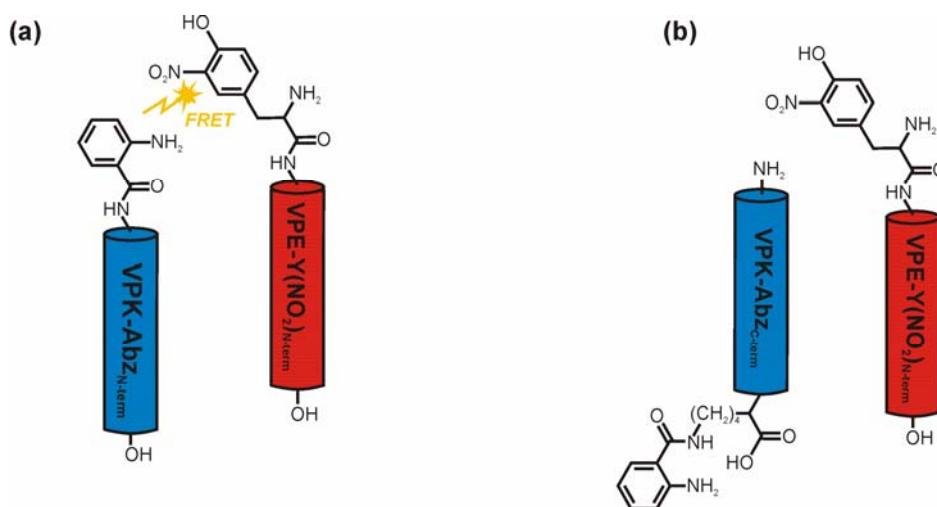


Abbildung 5.4. Schematische Darstellung der parallelen Anordnung von VPK-Abz_{N-term} + VPE-Y(NO₂)_{N-term} (a) und VPK-Abz_{C-term} + VPE-Y(NO₂)_{N-term} (b). Im ersten Fall ermöglicht die räumliche Nähe zwischen beiden Fluoreszenzlabeln die Löschung der Abz-Fluoreszenz durch Y(NO₂), wohingegen der größere Abstand zwischen Abz und Y(NO₂) bei der parallelen Anordnung von VPE-Y(NO₂)_{N-term} und VPK-Abz_{C-term} keine effiziente Löschung der Abz-Fluoreszenz zulässt.

Die Spezifität der parallelen Anordnung des VPK/VPE-Heteromers konnte mittels Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)¹⁶² nachgewiesen werden. Verwendet wurden hierfür die u.a. in der Arbeitsgruppe Koksich zur Bestimmung der Orientierung von *coiled coil*-Strukturen etablierten Label 4-Aminobenzoesäure (Abz) und 3-Nitrotyrosin

(Y(NO₂)).¹⁶³ 4-Aminobenzoesäure wurde dabei als Fluoreszenzdonor ($\lambda_{\text{ex}}=320\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}}=420\text{nm}$) im Peptid VPK am Ende der Peptidkette als zusätzliche Aminosäure eingebaut (VPK-Abz_{N-term}), bzw. über eine Lysin-Seitenkette am C-Terminus einer zweiten VPK-Variante eingefügt (VPK-Abz_{C-term}).¹⁶⁴ 3-Nitrotyrosin diente als Fluoreszenzakzeptor ($\lambda_{\text{abs}}=420\text{nm}$) und wurde am N-Terminus von VPE als zusätzliche Aminosäure eingebaut (VPE-Y(NO₂)_{N-term}). Ausgehend von der Bildung eines parallelen *coiled coil* ist für die Kombination von VPK-Abz_{N-term} und VPE-Y(NO₂)_{N-term} eine starke Löschung der Abz-Fluoreszenz zu erwarten. Die Kombination von VPK-Abz_{C-term} und VPE-Y(NO₂)_{N-term} sollte hingegen zu einer deutlich schwächeren Fluoreszenzlöschung führen, da hierbei der Abstand zwischen der 4-Aminobenzoesäure am C-Terminus von VPK und dem 3-Nitrotyrosin am N-Terminus von VPE deutlich größer sein sollte als der Förster-Radius dieses Donor-Akzeptor-Paares ($R_0=29\text{-}33\text{\AA}$)^{165,166} (Abbildung 5.4).

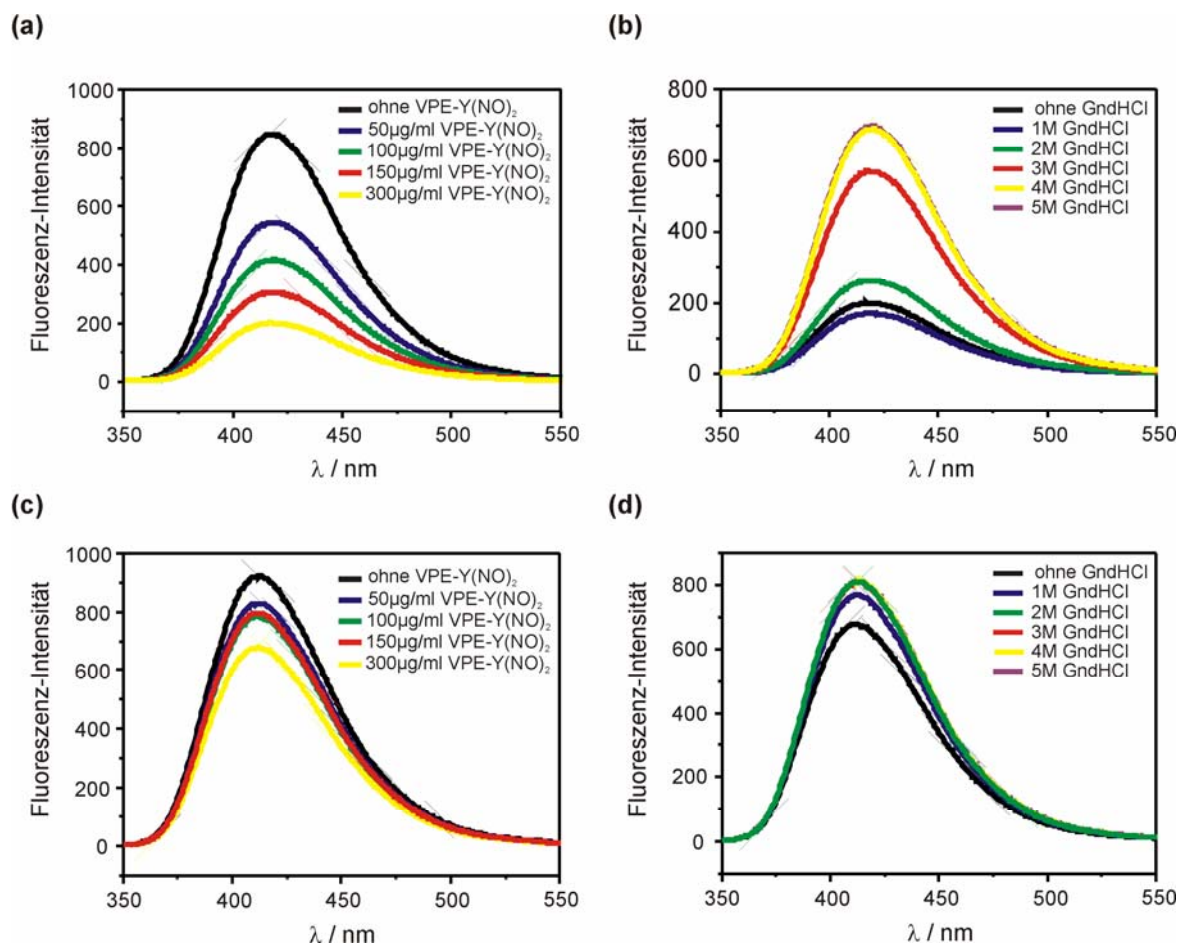


Abbildung 5.5. Fluoreszenzspektren der N- und C-terminal Abz-markierten VPK-Peptide. (a) 150 µg/ml VPK-Abz_{N-term} in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen VPE-Y(NO₂)_{N-term}; (b) Gemisch von VPK-Abz_{N-term} (150 µg/ml) und VPE-Y(NO₂) (300 µg/ml) bei unterschiedlichen Konzentrationen GndHCl; (c) 150 µg/ml VPK-Abz_{C-term} in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen VPE-Y(NO₂)_{N-term}; (d) Gemisch von VPK-Abz_{C-term} (150 µg/ml) und VPE-Y(NO₂)_{N-term} (300 µg/ml) bei unterschiedlichen GndHCl-Konzentrationen. Alle Spektren wurden bei RT in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 aufgenommen.

Die Fluoreszenzspektren von VPK-Abz_{N-term} in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen VPE-Y(NO₂)_{N-term} sind in Abbildung 5.5 a dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die Abnahme des Fluoreszenzsignals bei steigender Konzentration von VPE-Y(NO₂)_{N-term}. Um die Abhängigkeit der beobachteten Fluoreszenzlöschung von der Ausbildung einer parallelen *coiled coil*-Struktur zu überprüfen, wurde das Experiment unter denaturierenden Bedingungen wiederholt. Dabei wurde das Abz-Signal in einem Gemisch aus 150 µg/ml VPK-Abz_{C-term} und 300 µg/ml VPE-Y(NO₂)_{N-term} (maximale Fluoreszenzlöschung) bei steigenden GndHCl-Konzentrationen betrachtet, wobei eine kontinuierliche Zunahme des Fluoreszenzsignals beobachtet wurde (Abbildung 5.5 b). Das Maximum des Fluoreszenzsignals wurde bei 4 M GndHCl erreicht. Eine weitere Erhöhung der GndHCl-Konzentration führte zu keiner zusätzlichen Steigerung der Fluoreszenz. Diese Beobachtung stimmt gut mit den Ergebnissen der im CD verfolgten chemischen Denaturierung überein, die den Beginn der vollständigen Denaturierung der VPK/VPE-Dimere im gleichen Bereich der GndHCl-Konzentration gezeigt hat (Abbildung 5.3b).

Beide Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass die Ausbildung der *coiled coil*-Struktur und die damit verbundene räumliche Annäherung von Donor und Akzeptor die Ursache für die Fluoreszenzlöschung darstellt. Wie für eine parallele Anordnung zu erwarten, zeigt die Titration von VPK-Abz_{C-term} mit VPE-Y(NO₂)_{N-term} eine erheblich schwächere Fluoreszenzlöschung. Da Donor und Akzeptor in dieser Kombination an entgegengesetzten Enden des *coiled coil* lokalisiert sind, ist auch nach der Dimerisierung beider Peptide der Abstand zwischen Donor und Akzeptor größer als für eine effektive Fluoreszenzlöschung notwendig (Abbildung 5.5 c+d).

Der Oligomerisierungsgrad der VPK/VPE-Heteromere wurde mit Hilfe analytischer Ultrazentrifugation bestimmt. Ein Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment lieferte eine Molmasse von ca. 7000 Da für das VPK/VPE Heteromer und zeigte, dass neben dem Heterodimer keine weiteren Spezies vorliegen. Ein zusätzliches Experiment zum Sedimentationsgleichgewicht bestätigte dieses Ergebnis und ergab eine Molmasse von 7600 Da, welche sehr gut mit der für das VPK/VPE-Dimer errechneten Masse von 7580 Da übereinstimmt.¹⁶⁷

5.1.3 Test der Selektionsstrategie

Nach der experimentellen Überprüfung des Oligomerisierungsgrads und der Orientierung des Modellsystems, wurde die Stabilität der Bindung zwischen VPK und dem an der Phagenoberfläche präsentierten VPE-Peptid getestet. Hierfür wurde VPE an das Ende der C-terminalen Domäne des viralen Hüllproteins pIII fusioniert. Die Herstellung der

rekombinanten Phagen erfolgte unter Verwendung des *phagemid*-Vektors pComb3H, indem die das Peptid VPE codierende DNA an das 5' Ende des pIII-Gens kloniert wurde (siehe 4.1.2). Mit Hilfe der so gewonnenen Phagen wurde getestet, ob die *coiled coil*-Wechselwirkung zwischen VPE und VPK stark genug ist, um die VPE-präsentierenden Phagen an das immobilisierte VPK-Peptid zu binden.

5.1.3.1 Herstellung rekombinanter Phagen

Zum Einfügen der für VPE codierenden DNA in das pComb3H-Plasmid wurden zwei Schnittstellen der Endonuklease Sfi I innerhalb des Vektors genutzt. Der Vorteil bei der Verwendung dieses Restriktionsenzym liegt in der variablen Region innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz des Enzyms (GGCCNⁿNGGCC)¹⁶⁸ mit deren Hilfe zwei unterschiedliche Restriktionsstellen innerhalb eines Vektors eingefügt werden können, welche vom gleichen Enzym erkannt werden. Nach dem Verdau des Vektors mit dem Enzym wird das DNA-Segment zwischen den beiden Sfi I-Schnittstellen durch die das Peptid codierende DNA ersetzt, wobei die Selbstligation des geschnittenen Vektors durch die unterschiedlichen Schnittenden nicht möglich ist (Abbildung 5.6).

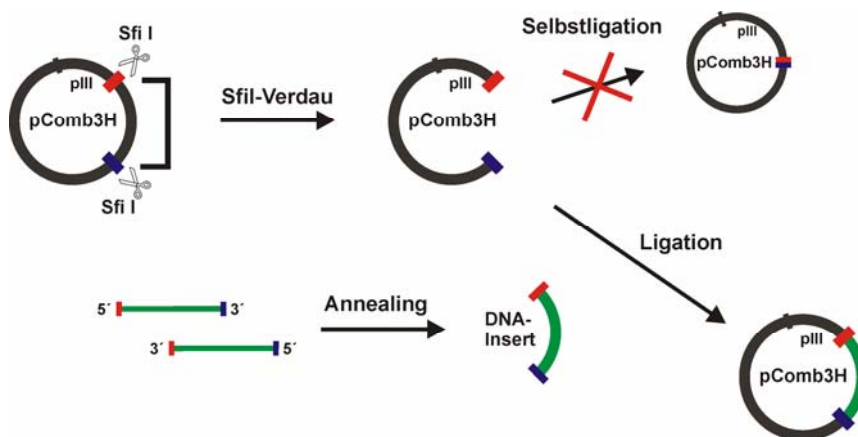


Abbildung 5.6. Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Insertion der VPE-codierenden DNA an das 5'-Ende des pIII-Gens in den phagemid-Vektor pComb3H. Die für das Peptid VPE codierende DNA ist grün dargestellt; die Sfi I-Schnittstellen sind rot und blau gekennzeichnet.

Die das VPE-Peptid codierende DNA wurde kommerziell bezogen, wobei die beiden komplementären Oligonukleotide so gewählt wurden, dass das DNA-Fragment nach dem *annealing* der beiden Stränge jeweils die zu den beiden Schnittstellen des verdauten Vektors komplementären Enden aufweist. Nach der Ligation und der Transformation des

neu kombinierten *phagemid*-Vektors in *E.coli* wurden die das Plasmid tragenden Bakterien mit Hilfe der auf dem Plasmid codierten Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Carbenicillin selektiert. Anschließend wurden nach Infektion der transformierten *E.coli*-Zellen mit M13-Helferphagen Bakteriophagen gewonnen, die das VPE-Peptid auf ihrer Oberfläche präsentieren.

5.1.3.2 Selektion

Für die Durchführung der Bindungstests wurde eine VPK-Variante synthetisiert, in der Biotin an den N-Terminus der Peptidsequenz angefügt wurde, um eine Immobilisierung an mit Streptavidin beschichteten Partikeln zu ermöglichen. Der Abstand zwischen VPK und dem Biotin wurde dabei durch ein zusätzliches Segment aus Gly-Ser-Gly vergrößert, um sterische Hinderungen während der Bindung zu minimieren.

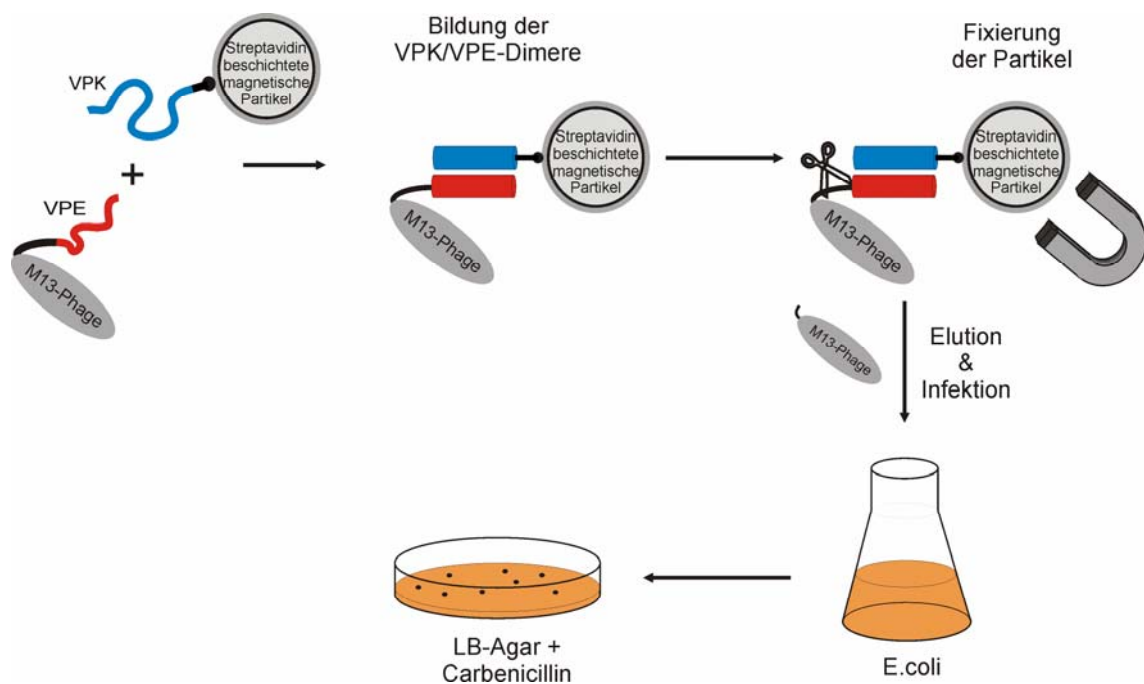


Abbildung 5.7. Schematische Darstellung der Bindungsreaktion, der Selektion und der Reinfizierung.

Der Ablauf der Bindungsreaktion sowie die anschließende Elution der selektierten Phagen sind in Abbildung 5.7 schematisch dargestellt. Das an mit Streptavidin beschichteten, magnetischen Partikeln (Dyna-Beads®) gebundene Peptid VPK wurde mit den VPE-tragenden Phagen inkubiert und die Partikel mehrmals mit Puffer gewaschen.

Anschließend wurden die über die VPE/VPK *coiled coil*-Wechselwirkung an die Partikel gebundenen Phagen durch Behandlung mit Trypsin von der Oberfläche gelöst.

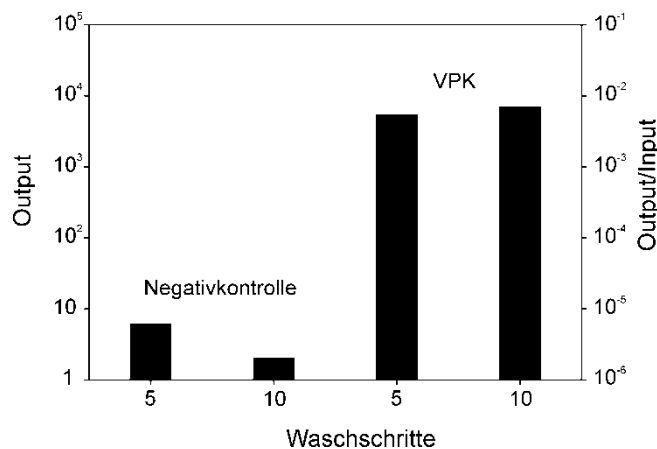


Abbildung 5.8. Test der *coiled coil* basierten Selektion VPE-präsentierender Phagen. Die Negativkontrolle wurde mit nicht modifizierten Partikeln durchgeführt. Das Waschen nach der Inkubation der Partikel mit den VPE-präsentierenden Phagen erfolgte jeweils mit 0,1% Tween20 in PBS.

Mit der so gewonnenen Phagensuspension wurde eine frische *E.coli*-Kultur infiziert und diese auf Carbenicillin-haltigen Agar-Platten kultiviert. Über die Anzahl der nach 12h Inkubation bei 37 °C gezählten Bakterienkolonien wurde die Anzahl der gebundenen Phagen berechnet. Als Negativkontrolle wurden in einem zweiten Versuch unbeladene Partikel mit den VPE-tragenden Phagen inkubiert und der oben beschriebenen Prozedur unterzogen. Dabei wurden deutlich weniger Phagen gebunden, womit gezeigt wurde, dass die Bindung der Phagen im ersten Experiment auf der VPK/VPE-Wechselwirkung beruht und es sich nicht um eine unspezifische Wechselwirkung mit der Oberfläche der verwendeten Partikel handelt (Abbildung 5.8).

5.2 Substitution in Position a₁₆

Nach der erfolgreichen Bindung VPE-präsentierender Phagen konnte mit der Konstruktion der VPE-Bibliothek begonnen werden. Für das erste Screening wurden in Position a₁₆ substituierte VPK-Varianten gewählt, da aus vorangegangenen Untersuchungen bekannt war, dass der Einbau fluoralkylsubstituierter Aminosäuren in einer zentralen a-Position einen weniger starken Einfluss auf die Stabilität des von VPK und VPE gebildeten *coiled coil* ausübt als die Substitutionen einer d-Position.¹⁶⁷

5.2.1 Konstruktion der Bibliothek VPE_{Bibo-a16}

Das *helical wheel*-Diagramm sowie die schematisierte Seitenansicht des substituierbaren VPK-Peptids und der VPE-Bibliothek sind in Abbildung 5.9 dargestellt. Der Einbau der fluorinierten Aminosäuren erfolgte in Position **a**₁₆. Die mit dieser Aminosäure wechselwirkenden Aminosäuren innerhalb des hydrophoben Kerns befinden sich in den Positionen **d'**₁₂, **a'**₁₆ und **d'**₁₉ im gegenüberliegenden VPE-Peptid. Zusätzlich wurde Position **g'**₁₅ randomisiert, welche sich ebenfalls in räumlicher Nähe zur Seitenkette der Aminosäure in Position **a**₁₆ befindet (Abbildung 5.9 b).

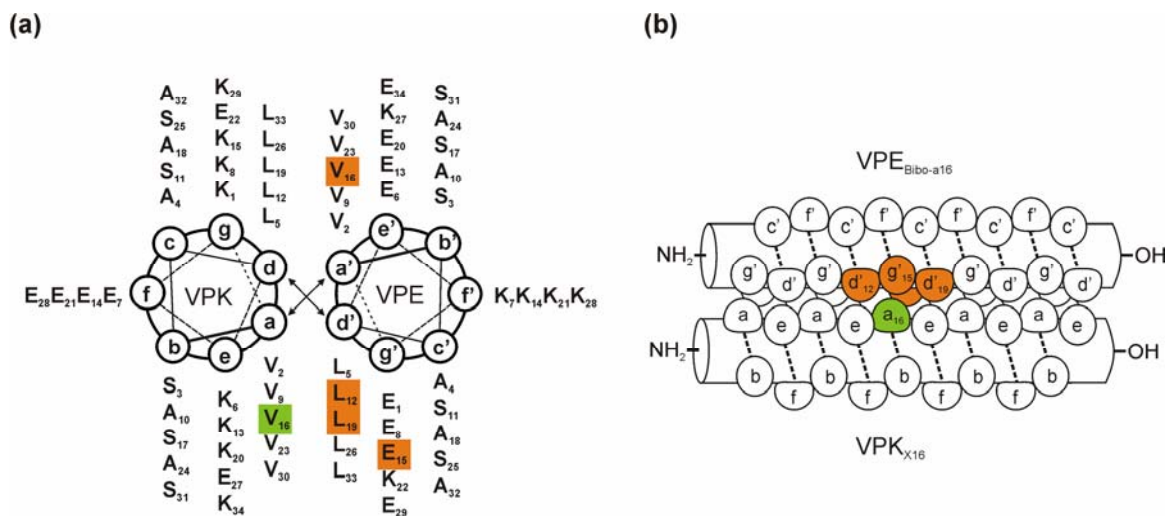


Abbildung 5.9. Das VPK/VPE-Dimer in der *helical wheel*-Darstellung (a) und in der Seitenansicht (b). Die Substitutionsposition in VPK ist grün hinterlegt; die vier randomisierten Positionen in VPE sind orange hervorgehoben.

Die Konstruktion der Bibliothek erfolgte durch Randomisierung der für die Aminosäurepositionen **d'**₁₂, **g'**₁₅, **a'**₁₆ und **d'**₁₉ codierenden Codons nach der NNK-Strategie. Dabei können die ersten beiden Positionen des entsprechenden Codons jedes (N) der vier möglichen Nukleotide enthalten, während die dritte Position entweder Guanin oder Thymin (K) enthält. Dadurch ergeben sich jeweils drei mögliche Codons für die Aminosäuren Arginin, Leucin und Serin, je zwei Codons für die Aminosäuren Valin, Threonin, Prolin, Alanin und Glycin und jeweils ein Codon für die übrigen 12 Aminosäuren. Mit Hilfe dieser Strategie können zwei der drei Stopp-Codons (TAA und TGA) ausgeschlossen werden, während jede der 20 kanonischen Aminosäuren durch mindestens ein Basentriplet in der Bibliothek vertreten ist. Die randomisierten Oligonukleotide wurden kommerziell bezogen und wie unter 5.1.3.1 beschrieben in das geschnittene Plasmid pComb3H ligiert.

Neben einem geringen Hintergrund und einer möglichst hohen Variabilität ist für eine erfolgreiche Selektion die Größe der Bibliothek von entscheidender Bedeutung. Die vier randomisierten Positionen ergeben $1,6 \times 10^5$ unterschiedliche Peptide. Damit jede der möglichen VPE-Sequenzen mit ausreichend hoher Wahrscheinlichkeit einmal auf der Phagenoberfläche präsentiert wird, sollte die Bibliothek daher mindestens eine Größe von $1,6 \times 10^6$ aufweisen.

Da das Volumen an Vektor-DNA, welche mittels Elektroporation transferiert werden kann begrenzt ist, war ein möglichst hoher Gehalt korrekt produzierter Plasmid-DNA erforderlich. Um die notwendige Größe der Bibliothek zu erreichen, mussten daher sowohl die *annealing*- als auch die Ligationsreaktion optimiert werden. Die Größe sowie der Hintergrund der Bibliothek wurden dabei über den Titer erfolgreich transfizierter Bakterien bestimmt. Besonders die Länge der DNA-Stränge von jeweils 115 Nukleotiden erschwerte dabei die *annealing*-Reaktion und limitierte die Größe der erhaltenen Bibliothek. Nach der Optimierung dieses Reaktionsablaufes sowie der Konzentration an Oligonukleotiden führte vor allem die Reinigung der doppelsträngigen DNA-Fragmente nach dem *annealing* mittels Agarosegelelektrophorese zu einer hohen Ligationsausbeute.

Tabelle 5.1. Aminosäuren, welche in den jeweils randomisierten Positionen in 13 zufällig gewählten Klonen der Phagenbibliothek VPE_{Bibo-a16} gefunden wurden.

Klon	Position d' ₁₂	Position g' ₁₅	Position a' ₁₆	Position d' ₁₉
1	Leu	Val	Arg	Leu
2	Phe	Arg	Arg	Arg
3	Ser	Gly	Pro	Leu
4	His	Glu	Pro	Met
5	Met	Ala	Ala	Arg
6	Leu	Leu	Val	Thr
7	Thr	Glu	Asn	Leu
8	Ser	Lys	Ser	Gln
9	Ala	Ser	Trp	Thr
10	Stopp	Arg	His	Ile
11	Lys	Pro	Met	Lys
12	Leu	Pro	Leu	Trp
13	Arg	Asn	Ile	Val

Die Anpassung der genannten Faktoren ergab schließlich eine Phagenbibliothek, die die gestellte Größenforderung mit ca. 2×10^6 Mitgliedern erfüllte und für die Selektionsversuche eingesetzt werden konnte. Zuvor musste jedoch die Varianz innerhalb der Phagenbibliothek getestet werden. Dazu wurden 15 Bakterienklone zufällig

ausgewählt und mittels PCR und zwei DNA-Primern, welche den künstlich eingefügten DNA-Abschnitt begrenzen, die DNA des Inserts amplifiziert und anschließend sequenziert. Dabei wiesen 13 der 15 untersuchten Klone die dem VPE-Peptid entsprechende DNA mit jeweils unterschiedlichen Aminosäurevariationen in den vier randomisierten Positionen auf (Tabelle 5.1). In den beiden übrigen Klonen fehlten aufgrund von Deletion Teile der Bibliotheks-DNA.

Da die an der Phagenoberfläche präsentierten Proteine rasch durch Proteasen abgebaut werden können, war es notwendig die Peptidbibliothek für den Einsatz in den Selektionsrunden jeweils neu herzustellen. Im einfachsten Fall wird hierfür die Phagenbibliothek reamplifiziert indem *E.coli*-Bakterien mit den Bibliotheksphagen infiziert werden und diese nach Superinfektion mit M13-Helferphagen neue Phagen produzieren. Allerdings besteht bei dieser Methode die Gefahr, dass Bibliotheksmitglieder mit geringerer Reproduktionsfähigkeit eliminiert werden und nicht für die spätere Selektion zur Verfügung stehen. Um die Effizienz der Reamplifizierung zu ermitteln, wurde daher der Titer der mit den Bibliotheksphagen infizierten Bakterien bestimmt. Der ermittelte Wert von ca. 10^9 lag dabei um mehr als zwei Größenordnungen über der Größe der zu amplifizierenden Bibliothek und deutete auf eine erfolgreiche Reamplifizierung hin. Darüberhinaus wurde von einigen Bakterienkolonien die DNA des Inserts sequenziert um die Varianz in der amplifizierten Phagenbibliothek zu testen und auszuschließen, dass bevorzugt Phagen mit bestimmten Peptidsequenzen vermehrt bzw. Mutationen, in denen das zu präsentierende Peptid fehlt favorisiert wurden. Wie Tabelle 5.2 zu entnehmen ist, wiesen alle getesteten Klone die korrekte DNA und jeweils unterschiedliche Aminosäuren in den randomisierten Positionen auf.

Tabelle 5.2. Sequenzierungsergebnisse nach Reamplifizierung der Phagenbibliothek .

Klon	Position d' ₁₂	Position g' ₁₅	Position a' ₁₆	Position d' ₁₉
1	Thr	Ala	Met	Ala
2	Stop	Val	Asn	Leu
3	Arg	Val	Pro	Leu
4	Ser	Met	Ser	Leu
5	Cys	Leu	Ser	Val
6	Arg	Met	Arg	Ile
7	Ser	Met	Phe	Pro

5.2.2 Test und Optimierung der Selektionsstrategie

Bevor mit der Selektion spezifischer Bindungspartner für die verschiedenen VPK-Varianten begonnen werden konnte, musste die Selektionsstrategie getestet und optimiert werden. Für den als *panning* bezeichneten Selektionsprozess stehen dabei zwei unterschiedliche Strategien zur Verfügung (Abbildung 5.10).

Zum einen kann die Bindung zwischen dem an der Phagenoberfläche präsentierten Peptid und dem Zielpeptid in Lösung erfolgen. Die Selektion der gebundenen Phagen erfolgt anschließend über ein Ankermolekül welches kovalent an das Zielpeptid gebunden ist. Der Vorteil dieser Methode liegt in der geringen sterischen Hinderung während der Bindungsreaktion. Allerdings ist eine Abtrennung von nicht gebundenen Zielpeptiden vor der Selektion der gebundenen Phagen nicht möglich, sodass diese mit den gebundenen Peptiden um die Bindungsstellen am Trägermaterial konkurrieren. Im Gegensatz dazu werden beim sog. Festphasen-*panning* zunächst die Zielpeptide am Trägermaterial fixiert, bevor die Inkubation mit der Phagenbibliothek erfolgt. Dadurch wird jedes an das Zielpeptid bindende Bibliotheksmitglied automatisch am Trägermaterial fixiert (Abbildung 5.10 b). Nach mehreren Waschschrinen verbleiben bei beiden Strategien nur die an das Zielpeptid gebundenen Phagen am Trägermaterial und können nach ihrer Elution und anschließender Amplifizierung für weitere Selektionsrunden genutzt werden.

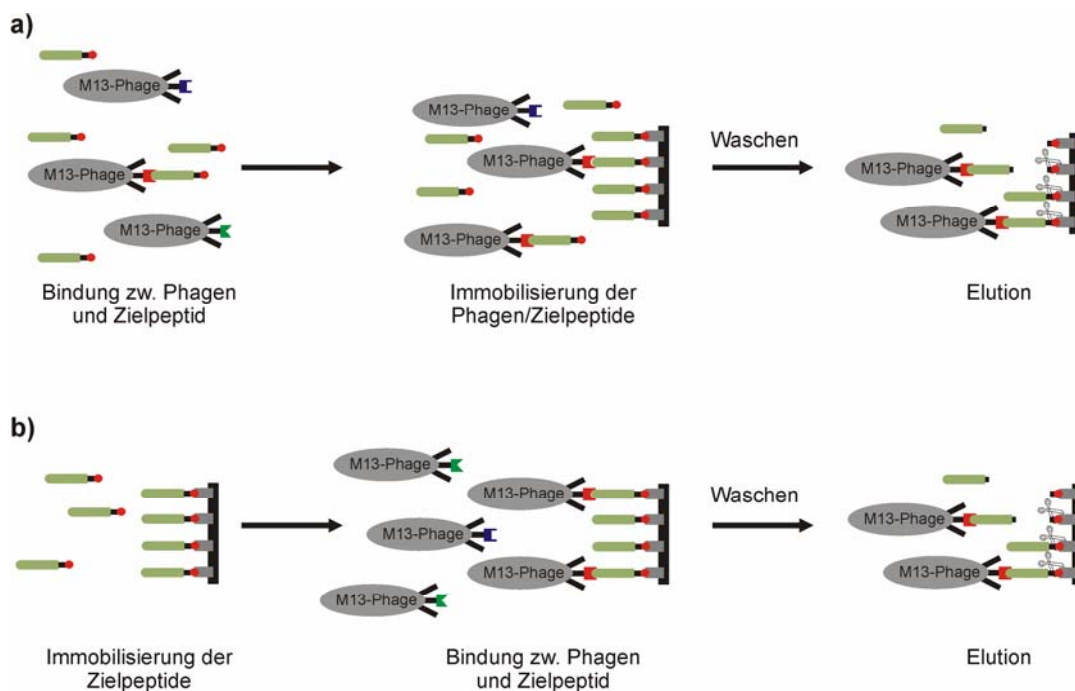


Abbildung 5.10. Schematische Darstellung des *solution state panning* (a) sowie des Festphasen-*pannings* (b).

Für das Screening der VPE-Bibliothek mit dem VPK-Peptid wurde die Strategie des Festphasen-*panning* angewendet, wie sie für den Ablauf der Bindungsreaktion zwischen VPK und dem an der Phagenoberfläche präsentem VPE-Wildtyp bereits unter 5.1.3.2 beschrieben wurde. Dabei wurde VPK zunächst über das endständige Biotin an Streptavidin-Moleküle auf der Oberfläche der magnetischen Partikel fixiert. Nicht an der Partikeloberfläche immobilisierte VPK-Moleküle wurden durch Waschen mit Puffer entfernt und unspezifische Bindungsstellen an den Partikeln mit Milchpulver blockiert. Anschließend wurden die mit VPK beladenen Partikel mit den Bibliotheksphagen inkubiert. Nach dem Entfernen nicht gebundener Bibliotheksmitglieder erfolgte die proteolytische Abtrennung der an die Partikel gebundenen Phagen. Die isolierten Phagen wurden durch Infektion von *E.coli*-Zellen und anschließender Superinfektion mit Helferphagen vermehrt, isoliert und in der folgenden *panning*-Runde verwendet. Insgesamt wurden fünf Runden aus Selektion und Reamplifizierung durchgeführt, wobei nach jeder Runde die Anzahl der für die Bindung eingesetzten Phagen (Input) sowie die Anzahl der nach der Selektion gebundenen Phagen (Output) ermittelt wurde.

Erwartungsgemäß konnte dabei eine deutliche Zunahme sowohl der absoluten Phagenzahl als auch des Output/Input-Verhältnisses verzeichnet werden. Gleichzeitig wurde ein Kontroll-*panning* an nicht mit VPK modifizierten Partikeln durchgeführt, bei welchem keine Anreicherung beobachtet wurde. Mit Hilfe dieser Negativkontrolle konnte gezeigt werden, dass die Selektion nicht die Folge unspezifischer Wechselwirkungen ist, sondern auf der Wechselwirkung zwischen einzelnen Mitgliedern der auf der Phagenoberfläche präsentierten VPE-Bibliothek und den an den Partikeln gebundenen VPK-Peptiden beruhte. Die Sequenzierung einiger nach der dritten und der fünften Selektionsrunde zufällig ausgewählter Klone bestätigte diese Annahme. Dabei wurden ausnahmslos Sequenzen mit der intakten, für VPE codierenden DNA gefunden, wobei in den vier randomisierten Positionen bereits nach der dritten Selektionsrunde die für eine *coiled coil*-Struktur typischen Aminosäuren gefunden wurden.

Wie aus Tabelle 5.3 zu entnehmen ist, handelte es sich dabei in den beiden **d**-Positionen nahezu ausschließlich um Leucin, welches auch im VPE-Wildtyp in diesen Positionen zu finden ist. In Position **a'**₁₆, welche in VPE durch Valin besetzt ist, fand sich mit Isoleucin ebenfalls eine hydrophobe, β -verzweigte Aminosäure, welche die in den **a**-Positionen paralleler *coiled coil*-Strukturen bevorzugt zu findenden Aminosäuren darstellen.¹⁶⁹ Die Selektion von Isoleucin anstelle von Valin ist dabei vermutlich auf die zusätzliche Methylengruppe des Isoleucins und die dadurch erhöhte Hydrophobie zurückzuführen, welche einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität der *coiled coil*-Struktur ausübt.¹⁷⁰

Tabelle 5.3. Sequenzierungsergebnisse für die erste Selektion der Bibliothek VPE_{Bibo-016} gegen VPK.

	Klon	Position d' ₁₂	Position g' ₁₅	Position a' ₁₆	Position d' ₁₉
Runde 3	1	Leu	Val	Val	Leu
	2	Leu	Tyr	Ile	Leu
	3	Leu	Leu	Leu	Leu
	4	Leu	Tyr	Ile	Leu
Runde 5	5	Leu	Tyr	Ile	Leu
	6	Leu	Tyr	Ile	Leu
	7	Tyr	Leu	Ile	Leu
	8	Leu	Leu	Leu	Leu

Während die Besetzung der drei randomisierten Positionen des hydrophoben Kerns (**d'₁₂**, **a'₁₆** und **d'₁₉**) weitgehend der Originalsequenz entsprach, konnte in keinem der sequenzierten Klone in Position **g'₁₅** Glutaminsäure gefunden werden. Stattdessen fanden sich auch in dieser Position hydrophobe Aminosäuren. Vermutlich setzten sich diese Aminosäuren durch, da sie die hydrophobe Interaktionsfläche zwischen VPK und VPE vergrößern und damit zu einer zusätzlichen Stabilisierung der *coiled coil*-Struktur führen.

Um die Konstanz in den Sequenzierungsergebnissen zu erhöhen, wurde versucht, die Selektionsprozedur zu optimieren, indem der Selektionsdruck während der Waschprozedur durch höhere Konzentrationen an Detergenz sowie den Zusatz von GndHCl im Waschpuffer erhöht wurde.

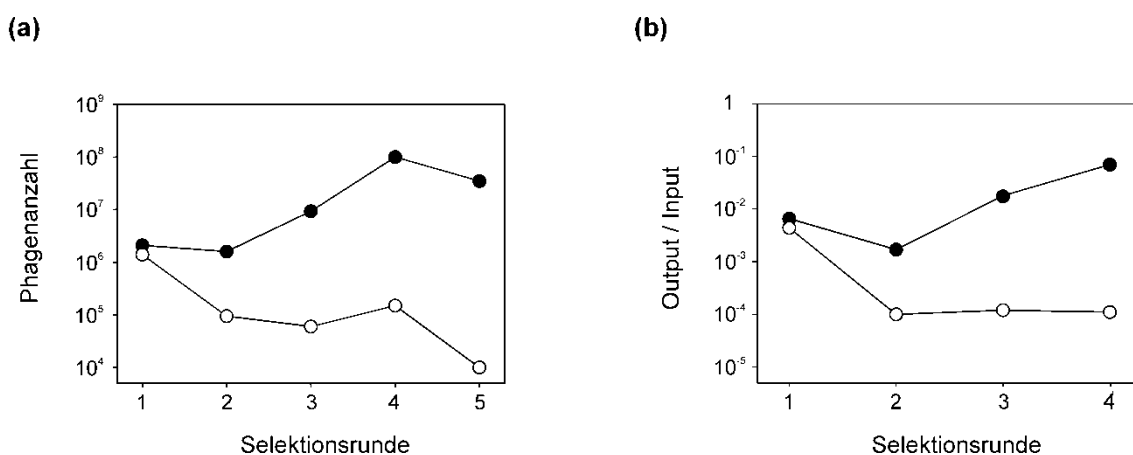


Abbildung 5.11. Verlauf der Phagenanreicherung während des panning gegen VPK. Der Phagentiter (a) gibt die Anzahl der nach jeder Runde selektierten Phagen an. Das Output/Input-Verhältnis (b) stellt den Quotienten aus den selektierten Phagen (Output) und den in der jeweiligen Runde eingesetzten Phagen (Input) dar. Die Negativkontrolle ist weiß, die Selektion gegen VPK schwarz dargestellt.

Gute Ergebnisse lieferte schließlich eine Selektionsprozedur bei der die Konzentration an Tween20 während der verschiedenen Selektionsrunden von 0,1% (Runde 1) auf 1,0% (Runde 2-5) erhöht wurde. In der fünften Selektionsrunde erfolgte durch den Zusatz von 1M GndHCl eine weitere Verschärfung der Waschbedingungen. Dadurch konnte die unspezifische Bindung der Phagen an der Oberfläche der Streptavidin-beschichteten Oberfläche nahezu vollständig verhindert werden.

Tabelle 5.4. Sequenzierungsergebnisse nach Selektion der Bibliothek VPE_{Bibo- α 16} gegen VPK.

Klon	Position d' ₁₂	Position g' ₁₅	Position a' ₁₆	Position d' ₁₉
1	Leu	Tyr	Ile	Leu
2	Leu	Tyr	Ile	Leu
3	Leu	Tyr	Ile	Leu
4	Leu	Tyr	Val	Leu
5	Leu	Leu	Ile	Tyr

Für die Selektion gegen das immobilisierte VPK-Peptid konnte dabei eine kontinuierliche Anreicherung an Phagen beobachtet werden, während in der Negativkontrolle die Anzahl selektierter Phagen konstant niedrig blieb (Abbildung 5.11). Darüberhinaus zeigte die anschließende Sequenzierung nur geringe Abweichungen innerhalb der selektierten VPE-Mutanten (Tabelle 5.4).

5.2.3 Selektion bevorzugter Wechselwirkungspartner für Asparagin in Position a₁₆

Nach der Herstellung der Phagenbibliothek und der Optimierung der *panning*-Prozedur sollte getestet werden, inwieweit das Screeningsystem in der Lage ist, die Veränderung, welche sich durch den Austausch von Val₁₆ im Zielpetids VPK ergibt, zu detektieren. Hierfür wurde eine VPK-Variante synthetisiert in der Valin in Position a₁₆ durch Asparagin ersetzt wurde. Asparagin ist als polare Aminosäure vergleichsweise häufig innerhalb des hydrophoben Kerns von *coiled coil*-Strukturen zu finden, wobei es durch die Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrücken zum Teil erheblichen Einfluss auf den Oligomerisierungsgrad und die Orientierung der Helices ausübt.^{171,172} Das *panning* gegen VPK-N₁₆ erfolgte unter den bereits für die Selektion gegen den VPK-Wildtyp beschriebenen Bedingungen. Wie die Sequenzierung fünf zufällig ausgewählter Klone zeigt, wurden auch in diesem Fall VPE-Varianten selektiert, in denen die Aminosäureverteilung in den vier variablen Positionen auf das Vorliegen einer stabilen *coiled coil*-Struktur schließen lässt

(Tabelle 5.5). Ähnlich den für den VPK-Wildtyp selektierten VPE-Sequenzen wurde dabei in beiden **d**-Positionen ausschließlich Leucin gefunden. Diese Positionen sind bereits im ursprünglichen VPE-Peptid mit Leucin besetzt. Darüberhinaus stellt Leucin die Aminosäure mit dem stärksten stabilisierenden Effekt in **d**-Position dimerer *coiled coil*-Strukturen dar.¹⁷³

In Position **g'**₁₅ wurde überwiegend Glutaminsäure selektiert, welche im VPE-Wildtyp ebenfalls in dieser Position zu finden ist und durch die Ausbildung einer Salzbrücke mit Lys₂₀ im gegenüberliegenden VPK-Peptid zur Stabilisierung der *coiled coil*-Struktur beiträgt. Das Screening gegen den VPK-Wildtyp lieferte im Gegensatz dazu ausschließlich VPE-Varianten, die Aminosäuren mit hydrophober bzw. aromatischer Seitenkette in dieser Position aufweisen. Vermutlich ermöglicht die polare Seitenkette von Asparaginsäure in Position **a**₁₆ keine Wechselwirkung mit einer hydrophoben Seitenkette in Position **g'**₁₅ des VPE-Peptids. Im Gegensatz zur Selektion gegen Valin (VPK-Wildtyp) wurde hier Glutaminsäure in dieser Position angereichert, welche durch ionische Wechselwirkungen mit Lys₂₃ im VPK-Peptid stärker zur Stabilität des *coiled coil*-Heteromers beiträgt.

Tabelle 5.5. Sequenzierungsergebnisse nach Selektion von VPK-N₁₆ gegen die Phagenbibliothek VPE_{Bibo-a16}.

Häufigkeit der gefundenen Sequenz	Position d' ₁₂	Position g' ₁₅	Position a' ₁₆	Position d' ₁₉
3x	Leu	Glu	Leu	Leu
1x	Leu	Ala	Leu	Leu
1x	Leu	Val	Leu	Leu

Der zweite Unterschied gegenüber dem *panning* mit VPK fand sich in Position **a'**₁₆ der selektierten VPE-Varianten. Im ersten Experiment wurde mit Isoleucin eine β -verzweigte hydrophobe Aminosäure gefunden, wie sie mit Valin auch im VPE-Wildtyp in dieser Position zu finden ist. Im Gegensatz dazu führte die Selektion mit VPK-N₁₆ zur Anreicherung von Leucin in Position **a'**₁₆.

Dieses Ergebnis war ein wenig überraschend, da Vergleiche der Stabilität unterschiedlich substituierter *coiled coil*-Peptiden gezeigt haben, dass die Wechselwirkung zwischen zwei Asparaginseitenketten die günstigste **a-a'**-Interaktion innerhalb eines parallelen *coiled coil*-Dimers darstellt.¹⁷⁴ Eine mögliche Ursache für die Abweichung von dem erwarteten Ergebnis liegt in der Verwendung unterschiedlicher *coiled coil*-Systeme. Um zu überprüfen ob mit der entwickelten Strategie der stabilste Wechselwirkungspartner für VPK-N₁₆ selektierte wurde, wurden sowohl die mittels Phage Display selektierte Variante VPE-L₁₆ als auch das theoretisch erwartete Peptid VPE-N₁₆ synthetisiert und die

thermische Stabilität der einzelnen Kombinationen von VPK-N₁₆ mit den verschiedenen VPE-Varianten bestimmt.

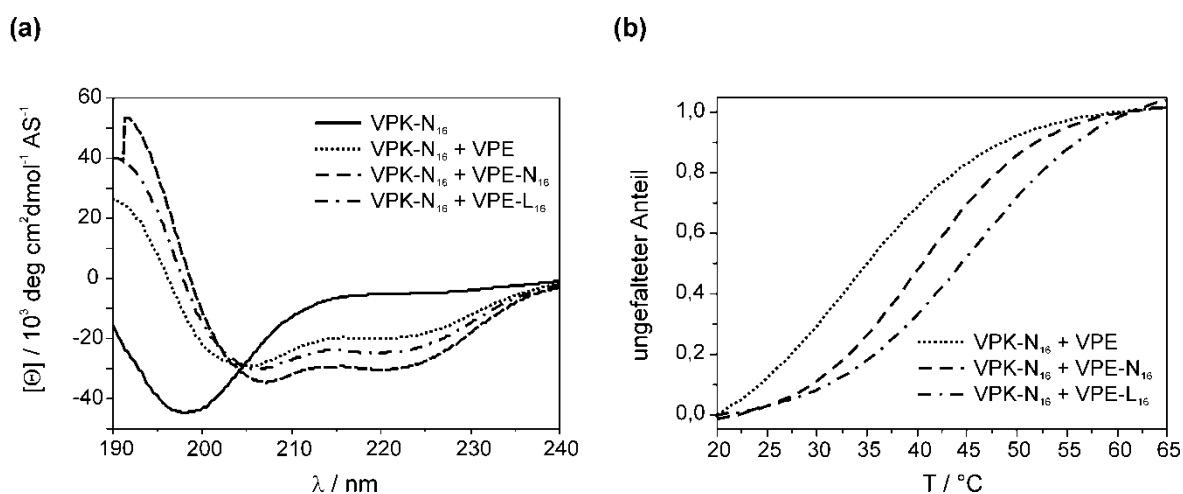


Abbildung 5.12. CD-Spektren (a) und thermische Denaturierung (b) von VPK-N₁₆ in Kombination mit VPE, VPE-N₁₆ und VPE-L₁₆. Die Spektren wurden jeweils bei 20 °C in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und einer Gesamtpeptidkonzentration von 20 μM aufgenommen. Die thermische Denaturierung erfolgte unter identischen Bedingungen (Puffer + Peptidkonzentration). Die dargestellten Kurven der thermischen Denaturierung wurden aus den Rohdaten wie unter 7.2.3 beschrieben gefittet.

Wie die jeweiligen CD-Spektren (Abbildung 5.12 a) zeigen, führt die Substitution von Val₁₆ gegen Asparagin zu einer starken Destabilisierung und verhindert die Ausbildung von VPK-N₁₆-Dimeren. Auch die Kombination mit dem VPE-Wildtyp deutet durch das nur schwach ausgeprägte Minimum bei 222 nm auf einen geringen helikalen Anteil und eine schwache *coiled coil*-Bildung hin. Die Kombination von VPK-N₁₆ mit VPE-N₁₆ und VPE-L₁₆ zeigt jeweils einen starken helikalen Anteil, wobei sich nach thermischer Denaturierung deutliche Unterschiede in der Stabilität beider Strukturen zeigten (Abbildung 5.12 b). Dabei erwies sich das von VPK-N₁₆ und VPE-L₁₆ gebildete *coiled coil* mit einem Schmelzpunkt von 45,5 °C als deutlich stabiler als das ursprünglich vermutete Paar VPK-N₁₆/VPE-N₁₆ ($T_m = 40,4$ °C) oder die Kombination mit dem VPE-Wildtyp ($T_m = 33,4$ °C) und bestätigt, dass mit VPE-L₁₆ der unter den gegebenen Bedingungen stabilste Wechselwirkungspartner für VPK-N₁₆ selektiert wurde.

5.2.4 Die Selektion bevorzugter Wechselwirkungspartner für DfeGly, DfpGly und TfeGly in Position a_{16}

Nachdem das Potential der Selektionsmethode am Beispiel von VPK-N₁₆ gezeigt werden konnte, wurde mit der Suche der bevorzugten Wechselwirkungspartner fluorierter Aminosäuren in Position a_{16} von VPK begonnen. Hierfür wurden die fluoralkylsubstituierten Aminosäuren (S)-4,4-Difluorethylglycin (DfeGly), (S)-4,4-Difluorpropylglycin (DfpGly) und (S)-4,4,4-Trifluorethylglycin (TfeGly) gewählt, deren Einfluss auf die Stabilität hydrophober Wechselwirkungen bereits mit Hilfe verschiedenen *coiled coil*-Peptide untersucht wurde (Abbildung 5.13).^{133,167,175}

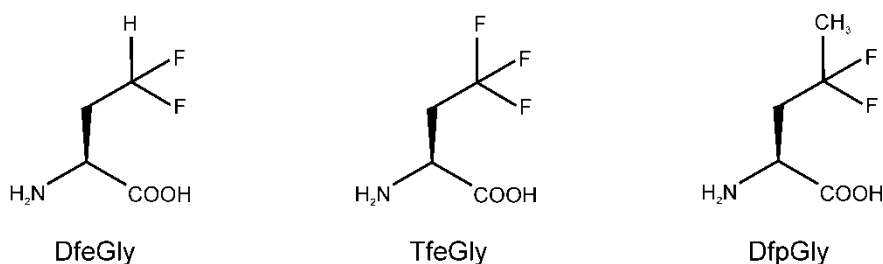


Abbildung 5.13. Struktur der fluorierten Aminosäuren (S)-4,4-Difluorethylglycin (DfeGly), (S)-4,4,4-Trifluorethylglycin (TfeGly) und (S)-4,4-Difluorpropylglycin (DfpGly).

Die beobachtete Destabilisierung der jeweiligen *coiled coil*-Struktur nach Substitution einer zentralen a - oder d -Position zeigte dabei deutlich die Unterschiede des Einflusses von Raumanpruch und Polarität der einzelnen Aminosäuren. Dabei konnten selbst scheinbar geringfügige Änderungen wie der Austausch eines einzelnen H-Atoms gegen ein Fluoratom detektiert werden.

Tabelle 5.6. Aminosäuresequenzen der für das Screening verwendeten, in Position a_{16} fluoralkyl-substituierten VPK-Varianten.

Peptid	Sequenz
Bio-VPK-DfeGly ₁₆	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEK DfeGly SALKEEVASLEEKVSALK-OH
Bio-VPK-DfpGly ₁₆	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEK DfpGly SALKEEVASLEEKVSALK-OH
Bio-VPK-TfeGly ₁₆	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEK TfeGly SALKEEVASLEEKVSALK-OH

Basierend auf der hohen Empfindlichkeit der *coiled coil*-Struktur gegenüber diesen Änderungen, sollte das entwickelte Screeningsystem genutzt werden, um in der hergestellten Peptid-Bibliothek nach VPE-Mutanten zu suchen, welche in der Lage sind

stabilere *coiled coil*-Dimere mit den in Position **a₁₆** substituierten VPK-Varianten auszubilden.

Die in Tabelle 5.6 aufgeführten, mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese hergestellten VPK-Varianten wurden über den N-ständigen Biotin-Rest auf der Oberfläche Streptavidin-beschichteter Partikel immobilisiert und für die Selektionsprozedur verwendet. Das Screening der VPE-Bibliothek erfolgte unter den bereits für VPK und VPK-N₁₆ optimierten Bedingungen, wobei nach jeweils fünf Selektionsrunden für jede der fluorierten VPK-Varianten eine starke Phagenanreicherung beobachtet werden konnte. Die Sequenzierung der DNA zufällig ausgewählter Phagen aus der jeweils letzten Selektionsrunde lieferte die in Tabelle 5.7 aufgeführten VPE-Sequenzen.

Tabelle 5.7. Aminosäureverteilung in den variablen Positionen der gegen VPK-DfeGly₁₆, VPK-DfpGly₁₆ und VPK-TfeGly₁₆ selektierten VPE-Mutanten.

	Häufigkeit der gefundenen Sequenz	Position d' ₁₂	Position g' ₁₅	Position a' ₁₆	Position d' ₁₉
VPK-DfeGly₁₆	5×	Leu	Leu	Ile	Tyr
	1×	Leu	Ala	Ile	Leu
	1×	Leu	Tyr	Ile	Leu
	1×	Leu	Val	Ile	Leu
	1×	Leu	Tyr	Val	Leu
VPK-DfpGly₁₆	4×	Leu	Leu	Ile	Tyr
	3×	Leu	Tyr	Ile	Leu
	1×	Leu	Val	Ile	Leu
	1×	Tyr	Leu	Ile	Leu
VPK-TfeGly₁₆	4×	Leu	Leu	Ile	Tyr
	2×	Phe	Leu	Ile	Leu
	1×	Leu	Tyr	Ile	Leu
	1×	Leu	Tyr	Val	Leu

In Position **g'₁₅** fanden sich, ebenfalls analog zum *panning* gegen das Originalpeptid, aliphatische hydrophobe Aminosäuren sowie Tyrosin, wobei Leucin und Tyrosin mit Abstand am häufigsten auftraten. Die Positionen **d'₁₂** und **d'₁₉** waren entweder mit Leucin oder den aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin besetzt. Dabei traten die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin, unabhängig von der Art der fluoralkylsubstituierten Aminosäure in der VPK-Variante, fast ausschließlich in **d'₁₉** und nur selten in **d'₁₂** auf. Darüberhinaus ist auffällig, dass in jeder selektierten VPE-Sequenz jeweils nur eine aromatische Aminosäure zu finden war.

Prinzipiell lassen sich die selektierten VPE-Mutanten in drei Peptidsequenzen zusammenfassen, welche jeweils mit unterschiedlicher Häufigkeit als Wechselwirkungspartner für die verschiedenen VPK-Varianten selektiert wurden (Tabelle 5.8).

Tabelle 5.8. Aminosäureverteilung in den randomisierten Positionen der bevorzugt als Wechselwirkungspartner für VPK, VPK-DfeGly₁₆, VPK-DfpGly₁₆ oder VPK-TfeGly₁₆ selektierten VPE-Peptide.

	Position d' ₁₂	Position g' ₁₅	Position a' ₁₆	Position d' ₁₉
VPK	Leu	Tyr oder Leu	Ile	Leu oder Tyr
VPK-DfeGly₁₆	Leu	hydrophobe Aminosäuren	Ile	Tyr oder Leu
VPK-DfpGly₁₆	Leu	Leu oder Tyr	Ile	Leu oder Tyr
VPK-TfeGly₁₆	Leu oder Phe	Leu oder Tyr	Ile	Tyr oder Leu

Mit der nahezu ausschließlichen Selektion von Isoleucin erwies sich Position **a'₁₆** als am stärksten konserviert. In den übrigen drei Positionen fanden sich hydrophobe Aminosäuren, bei denen es sich hauptsächlich um Leucin sowie die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin handelte. Dabei war jeweils in einer der drei Positionen eine aromatische Aminosäure zu finden, während die übrigen Positionen mit Leucin besetzt waren. Lediglich die für VPK-DfeGly₁₆ selektierten Peptide zeigten eine etwas höhere Varianz in Position **g'₁₅**, in der neben Leucin und Tyrosin auch Alanin und Valin selektiert wurde. Dennoch handelt es sich auch hierbei jeweils um Aminosäuren mit hydrophober bzw. aromatischer Seitenkette.

Der strukturelle Vorteil, welcher sich durch die Selektion aromatischer Aminosäuren für die Ausbildung der *coiled coil*-Struktur ergibt, ist anhand der bisherigen Erkenntnisse schwer zu erklären. Da sowohl Phenylalanin, als auch Tyrosin zu finden waren, ist eine Beteiligung der Tyrosin-Hydroxylgruppe an polaren Wechselwirkungen unwahrscheinlich, zumal die Tyrosinseitenkette in Proteinen gewöhnlich ungeladen vorliegt. Dennoch sind einige Beispiele bekannt, in denen aromatische Aminosäuren erheblichen Einfluss auf die Stabilität von *coiled coil*-Peptiden ausüben. So ist beispielsweise Tyr₃₆₂ in Kinesin-Proteinen entscheidend für die Ausbildung einer stabilen *coiled coil*-Struktur, wobei die genaue Funktion dieses Restes in der **g**-Position des genannten Proteins noch nicht vollständig geklärt werden konnte.¹⁷⁶

Eine mögliche Erklärung der in Position **g'₁₅** selektierten Tyrosin-Reste besteht in der Ausbildung von Kation- π -Wechselwirkungen zwischen dem Phenylring der Tyrosin-Seitenkette und der Aminofunktion einer Lysin-Seitenkette.^{177,178} Diese Wechselwirkungen treten am häufigsten zwischen direkt benachbarten Aminosäuren auf und könnten im Fall von VPE zw. Tyr'₁₅ und Lys'₁₄ ausgebildet werden (Abbildung 5.14 a).¹⁷⁹ Darüberhinaus ist

eine Wechselwirkung mit der Aminofunktion der Lysinseitenkette in Position e_{20} des gegenüberliegenden VPK-Peptids denkbar (Abbildung 5.14 b).

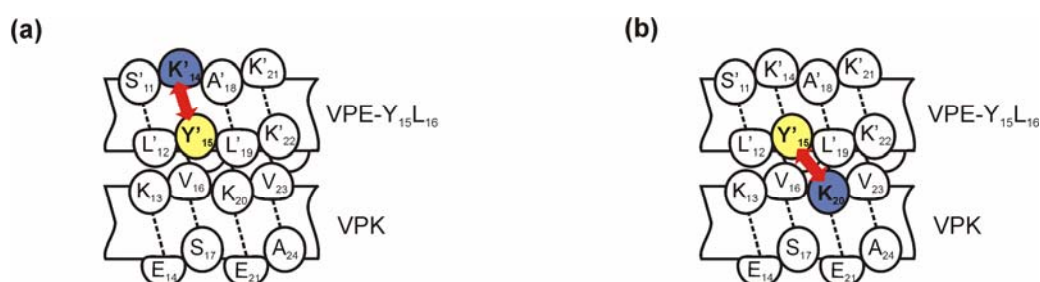


Abbildung 5.14. Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen VPK und VPE-Y₁₅L₁₆. (a) zeigt die Position einer möglichen Kation- π -Wechselwirkung zwischen Tyr[']₁₅ und Lys[']₁₄ innerhalb von VPE-Y₁₅L₁₆ während die interhelikale Wechselwirkung zwischen Tyr[']₁₅ (VPE-Y₁₅L₁₆) und Lys₂₀ (VPK) unter (b) dargestellt ist.

Das Auftreten aromatischer Aminosäuren in einer der beiden randomisierten **d**-Positionen lässt sich durch intramolekulare Kation- π -Wechselwirkungen nicht erklären. Möglich wäre jedoch auch in diesem Fall die Wechselwirkung mit der gegenüberliegenden **e**-Position des Peptids VPK.

Obwohl sich die verschiedenen VPE-Varianten bezüglich der Häufigkeit mit welcher sie für die unterschiedlich substituierten VPK-Peptide selektiert wurden unterscheiden, war eine genauere Charakterisierung der selektierten VPK/VPE-Heteromere notwendig. Hierfür wurden die drei am häufigsten selektierten VPE-Varianten synthetisiert, um die Struktur sowie die thermische Stabilität der einzelnen VPK-X₁₆/VPE_{selekt.}-Kombinationen zu bestimmen (Tabelle 5.9). Mit Hilfe dieser Experimente sollte herausgefunden werden, welches der selektierten VPE-Peptide jeweils die stabilste *coiled coil*-Struktur mit den einzelnen VPK-Varianten ausbildet.

Tabelle 5.9. Aminosäuresequenzen der aus den Phage Display-Ergebnissen abgeleiteten VPE-Varianten.

Peptid	Sequenz
VPE	Abz-EVSALEKEVASLEKEVSALEKKVASLKKEVSALE-OH
VPE-L ₁₅ L ₁₆	Abz-EVSALEKEVASLEKLISALEKKVASLKKEVSALE-OH
VPE-L ₁₅ L ₁₆ Y ₁₉	Abz-EVSALEKEVASLEKLISAYEKKVASLKKEVSALE-OH
VPE-Y ₁₅ L ₁₆	Abz-EVSALEKEVASLEKYISALEKKVASLKKEVSALE-OH

Erwartungsgemäß zeigten die CD-Spektren für jede VPE-Mutante in Kombination mit einer der fluorierten VPK-Varianten die für eine α -helikale Struktur charakteristischen Minima

bei 208 nm und 222 nm. Die Schmelzpunkte der verschiedenen *coiled coil*-Heteromere zeigen, dass die thermische Stabilität der verschiedenen *coiled coil*-Heteromere bis auf wenige Ausnahmen durch die selektierten VPE-Varianten erhöht wurde (Tabelle 5.10 + Abbildung 5.15).

Tabelle 5.10. Schmelzpunkte der VPK- X_{16} /VPE_{selekt.}-Heteromere. Die jeweils stabilste Kombination aus VPK- X_{16} und VPE_{selekt.} ist grau hinterlegt.

	VPE-L ₁₅ I ₁₆	VPE-Y ₁₅ I ₁₆	VPE-L ₁₅ I ₁₆ Y ₁₉	VPE
VPK	74,9 °C	74,0 °C	72,1 °C	72,4 °C
VPK-TfeGly ₁₆	74,4 °C	70,3 °C	69,0 °C	69,4 °C
VPK-DfpGly ₁₆	74,2 °C	70,9 °C	70,4 °C	70,1 °C
VPK-DfeGly ₁₆	73,3 °C	67,5 °C	65,3 °C	63,9 °C

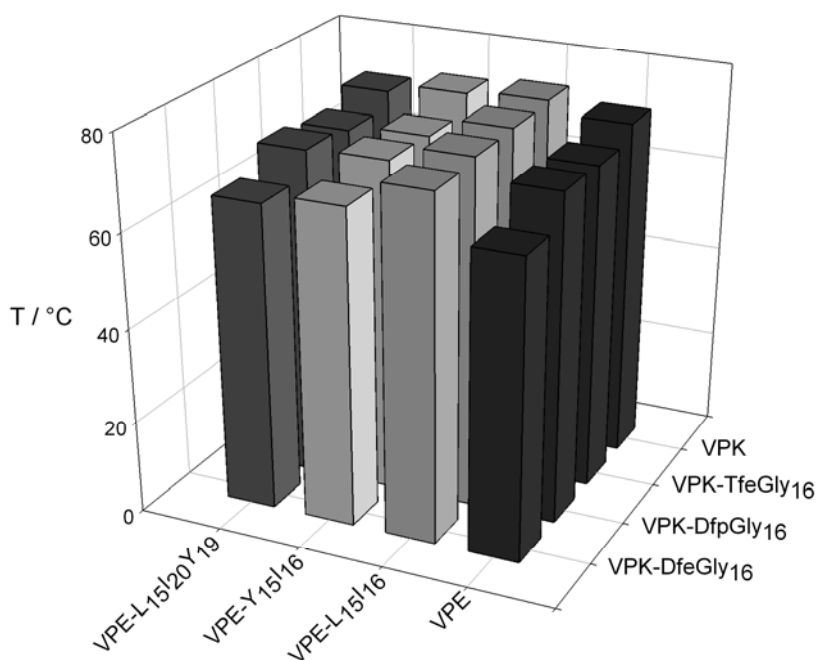


Abbildung 5.15. Vergleichende Darstellung der thermischen Stabilität unterschiedlicher, in Position α_{16} substituierter VPK-Varianten in Kombination mit den jeweils selektierten VPE-Varianten. Die Werte der entsprechenden Schmelzpunkte sind in Tabelle 5.10 aufgeführt.

Anders als aufgrund der unterschiedlichen Häufigkeit, mit der die einzelnen VPE-Sequenzen als Wechselwirkungspartner für die verschiedenen Aminosäuren in Position α_{16} von VPK selektiert wurden, erwies sich die Kombination mit VPE-L₁₅I₁₆ für alle VPK-Varianten als die Stabilste. Bemerkenswerterweise handelt es sich hierbei um eine Peptidsequenz, die für keines der substituierten VPK-Peptide selektiert wurde. Stattdessen

wurden die Positionen d'_{12} , g'_{15} und d'_{19} mit der am häufigsten selektierten Aminosäure Leucin und Position a'_{16} mit Isoleucin besetzt. Für die beiden d -Positionen wurde wie bereits im VPE-Wildtyp Leucin gewählt, da diese Aminosäure in beiden Positionen am häufigsten gefunden wurde. Die ursprünglich in VPE an Position g_{15} platzierte Glutaminsäure wurde durch Leucin ersetzt, welches als Vertreter der unterschiedlichen, in dieser Position gefundenen hydrophoben Aminosäuren gewählt wurde. In Position a'_{16} wurde entsprechend den Sequenzierungsergebnissen Isoleucin anstelle von Valin eingebaut.

Für alle in Position a_{16} fluoralkylsubstituierten VPK-Varianten konnte durch diese Kombination aus Selektion und rationalem Design die thermische Stabilität der *coiled coil*-Heteromere z.T. beträchtlich erhöht werden, wobei mit einem Betrag von 10 K für VPK-DfeGly₁₆ der mit Abstand größte Stabilitätsgewinn erzielt wurde. Am geringsten fielen die Stabilitätsgewinne für den VPK-Wildtyp aus. Die Schmelzpunkte der VPK/VPE_{selekt.}-Heteromere lagen maximal 2,5 °C über den Werten des ursprüngliche VPK/VPE-Dimers, wobei die Kombination mit VPE-L₁₅I₁₆Y₁₉ zu einem Stabilitätsverlust gegenüber dem VPK/VPE-Dimer führte. Auch für VPK-TfeGly₁₆ zeigte die Kombination mit VPE-L₁₅I₁₆Y₁₉ einen geringeren Schmelzpunkt, während für VPK-DfeGly₁₆ und VPK-DfpGly₁₆ im Vergleich zu den VPK-X/VPE-Dimeren geringfügig höhere Schmelzpunkte bestimmt wurden.

Die aromatische Seitenkette des Tyrosins innerhalb des hydrophoben Kerns trägt scheinbar nur wenig zur Stabilität der *coiled coil*-Heteromere bei bzw. wirkt dieser entgegen. Die einzige Ausnahme bildet VPK-DfeGly₁₆, für das eine Erhöhung des Schmelzpunktes um 1,4 °C verzeichnet werden konnte. Möglicherweise liegt die Ursache hierfür im geringeren räumlichen Anspruch der DfeGly-Seitenkette und in der dadurch bedingten günstigeren Packung der Aminosäureseitenkette innerhalb des hydrophoben Kerns.

Insgesamt konnte die Stabilität der VPK-DfeGly₁₆-Heteromere in Kombination mit den selektierten VPE-Varianten am stärksten erhöht werden. Vermutlich kann die geringere Hydrophobie von DfeGly durch den verstärkten Einbau hydrophober Aminosäuren gut kompensiert werden, während die im Vergleich zu den anderen untersuchten Aminosäuren geringe Größe nur eine geringe sterische Irritation hervorruft. Der höhere Raumanspruch von TfeGly und DfpGly scheint dagegen dem durch die höhere Hydrophobie der selektierten VPE-Varianten erzielten Stabilitätsgewinn entgegen zu wirken und erklärt die geringere Stabilität der von VPK-DfpGly₁₆ und VPK-TfeGly₁₆ ausgebildeten *coiled coil*-Strukturen. Gegenüber dem VPK/VPE-Wildtyp zeigten die von VPK und den selektierten VPE-Peptiden gebildeten Heteromere einen vergleichsweise geringen Stabilitätsgewinn, wodurch die günstige räumliche Anordnung innerhalb des VPK/VPE-Heteromers verdeutlicht wird.

Der genaue Einfluss der einzelnen Aminosäuren in den Positionen **d'**₁₂, **g'**₁₅, **a'**₁₆ und **d'**₁₉ auf die Stabilität der unterschiedlichen VPK/VPE-Heteromere ist auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht zu bestimmen. Möglichweise könnten Einzelmutationszyklen genauere Antworten auf diese Fragestellung liefern. Die Variabilität der selektierten VPE-Varianten basiert vermutlich auf der vergleichsweise hohen Akzeptanz des *coiled coil*-Motivs bezüglich der Substitution einer einzelnen Aminosäure innerhalb des hydrophoben Kerns.¹⁸⁰ Die Selektion hydrophober Aminosäuren erfüllt dabei die grundlegenden Anforderungen zur Stabilisierung dieses Strukturmotivs. Die Analyse der Schmelzpunkte zeigte, dass die Stabilitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Heteromeren relativ gering sind und erklärt die Selektion der unterschiedlichen VPE-Peptide.

Dennoch liefern die ermittelten Ergebnisse wichtige Informationen über die Wechselwirkungen fluoralkylsubstituierter Aminosäuren innerhalb hydrophober Peptidstrukturen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren DfeGly, DfpGly und TfeGly unter den im Experiment vorgegebenen strukturellen Bedingungen des *coiled coil*-Faltungsmotivs bevorzugt mit den Aminosäuren wechselwirken, welche auch von der natürlichen hydrophoben Aminosäuren Valin als Wechselwirkungspartner favorisiert werden. Die Unterschiede in Größe, Polarität und Hydrophobie der untersuchten Aminosäureseitenketten führen demnach nicht zur Selektion unterschiedlicher Wechselwirkungspartner innerhalb des *coiled coil*. Vielmehr zeichnet sich auch für diese Aminosäuren der günstigste Wechselwirkungspartner in erster Linie durch eine hohe Hydrophobie aus.

5.3 Substitution in Position **d**₁₉

Bei genauer Betrachtung der Seitenkettenanordnung innerhalb des hydrophoben Kerns eines parallelen *coiled coil* wird ersichtlich, dass sich die Packung der Seitenketten in der **a**- und **d**-Position erheblich unterscheidet.¹⁸¹ Am deutlichsten äußert sich dieser Unterschied in der Orientierung der C_α-C_β-Vektoren. In der **a**-Position zeigen diese in entgegengesetzte Richtung, während sie in den **d**-Positionen in einer Richtung aufeinander zeigen. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Winkel zwischen den Vektoren in den **a**- und **d**-Positionen, sowie unterschiedliche Abstände zwischen den C_β-Atomen der jeweils miteinander wechselwirkenden Seitenketten. Dabei stehen die Reste der **d**-Positionen in deutlich dichterem Abstand zueinander als die Seitenketten der **a**-Positionen (Abbildung 5.16).

Aufgrund der unterschiedlichen Orientierung der Seitenketten in beiden Positionen, übt die Substitution einer **a**-Position einen anderen Effekt auf die Stabilität der *coiled coil*-Struktur aus, als die einer **d**-Position. Im Fall des verwendeten VPK/VPE-Systems führte

der Austausch von Leucin gegen verschiedene fluorierte Aminosäuren in Position \mathbf{d}_{19} prinzipiell zu einer deutlich stärkeren Destabilisierung des *coiled coil* als der Einbau dieser Aminosäuren in Position \mathbf{a}_{16} .¹⁶⁷ In einer zweiten Versuchsreihe sollte daher untersucht werden, welche Wechselwirkungspartner in Position \mathbf{d}_{19} substituierte VPK-Peptide bevorzugen. Hierfür musste zunächst eine neue VPE-Bibliothek hergestellt werden aus welcher anschließend die jeweils besten Bindungspartner für die unterschiedlichen VPK-Varianten selektiert werden konnten.

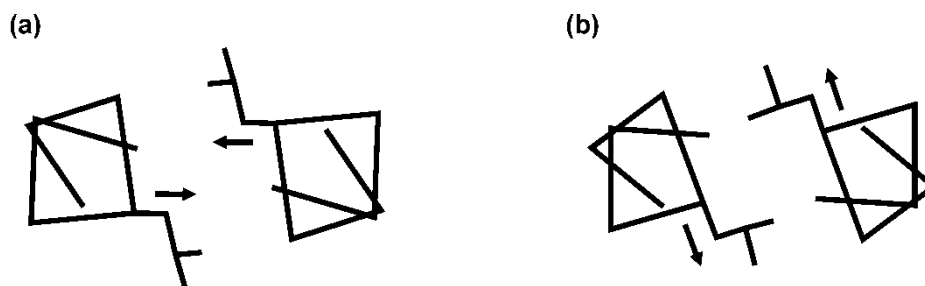


Abbildung 5.16. Unterschiedliche Packung der Aminosäuren in (a) \mathbf{a} - und (b) \mathbf{d} -Position eines parallelen *coiled coil* (nach Monera *et al.*¹⁸¹).

5.3.1 Konstruktion der Bibliothek VPE_{Bibo-d19}

Die für das Screening der Position \mathbf{d}_{19} in VPK erforderliche VPE-Bibliothek ist in Abbildung 5.17 dargestellt. Als direkt mit der Aminosäure in Position \mathbf{d}_{19} wechselwirkende Aminosäuren, wurden die Positionen \mathbf{a}'_{16} , \mathbf{d}'_{19} und \mathbf{a}'_{23} randomisiert. Zusätzlich wurde die Position \mathbf{e}'_{20} randomisiert welche sich ebenfalls in räumlicher Nähe zur Seitenkette der Aminosäure in Position \mathbf{d}_{19} befindet.

Die Konstruktion der Bibliothek erfolgte nach dem unter 5.2.1 beschriebenen Protokoll. Nachdem mit $2,26 \times 10^6$ Mitgliedern die erforderliche Größe der Bibliothek erreicht war, wurde die Phagenbibliothek reamplifiziert um auszuschließen, dass dabei die Varianz der Bibliothek beeinträchtigt wird. Dazu wurde eine *E.coli*-Kultur mit den Bibliotheksphagen inkubiert und die infizierten Bakterien auf Carbenicillin-haltigen Agarplatten kultiviert. Aus den in Folge der Infektion antibiotikaresistenten Bakterien wurden 15 Kolonien ausgewählt und einem PCR-Scan unterzogen.

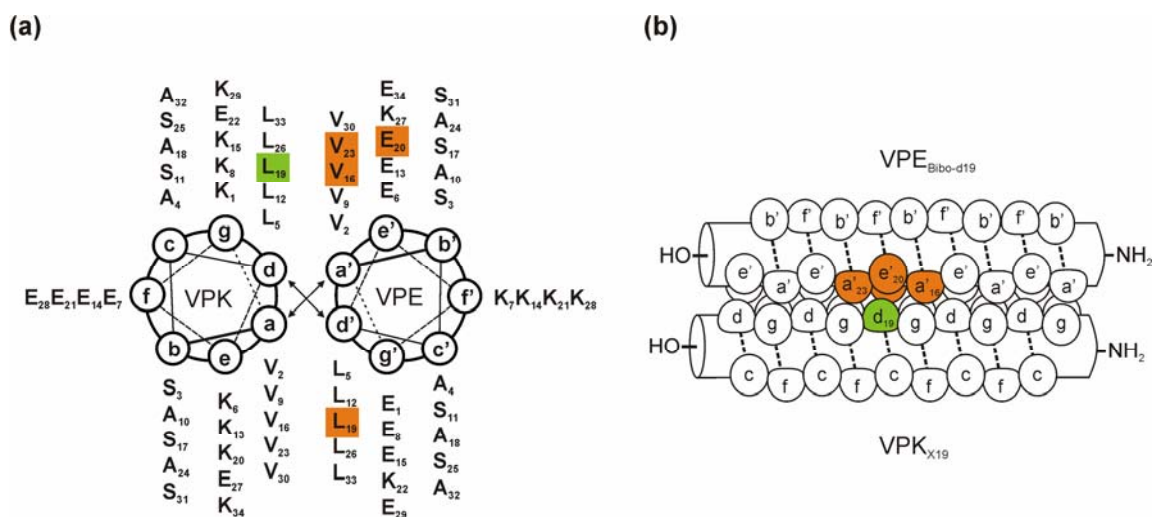


Abbildung 5.17. Das VPK/VPE-Dimer in der helical wheel-Darstellung (a) und in der Seitenansicht (b). Die Substitutionsposition in VPK ist grün hinterlegt; die vier randomisierten Positionen in der VPE-Bibliothek sind orange hervorgehoben.

Anschließend wurde die für das VPE-Peptid codierende DNA sequenziert. 13 der 15 untersuchten Klone zeigten dabei die korrekte, für VPE codierende DNA und die in den vier randomisierten Positionen erforderliche Diversität (Tabelle 5.11). Die übrigen beiden Klone wiesen eine Deletion der für die Positionen 19 bis 21 codierenden Basentriplets bzw. unklare Sequenzierungsergebnisse auf.

Tabelle 5.11. Aminosäureverteilung in den vier randomisierten Positionen der nach Reamplifizierung gewonnenen Bibliotheksphagen.

Klon	Position a'16	Position d'19	Position e'20	Position a'23
1	Ser	His	Glu	Pro
2	Thr	Thr	Leu	Tyr
3	Ser	Ser	Glu	Thr
4	Ser	Phe	Val	Val
5	His	Met	Gly	His
6	Ile	Arg	Leu	Leu
7	Phe	Pro	Thr	Thr
8	Val	Phe	Arg	Cys
9	Ser	Trp	Ser	Ser
10	Cys	Ile	Ala	Gly
11	Stopp	Arg	Arg	Arg
12	Gly	Asp	Leu	Asp
13	Leu	Tyr	Glu	Gln

5.3.2 Selektion gegen VPK

Nach der erfolgreichen Konstruktion der Bibliothek wurde diese zunächst im *panning* gegen den VPK-Wildtyp getestet. Dabei wurde die bereits für die Selektion der Bibliothek $VPE_{Bibo-a16}$ optimierte *panning*-Prozedur angewendet, welche auch in diesem Fall zu einer starken Phagenanreicherung führte (Abbildung 5.18).

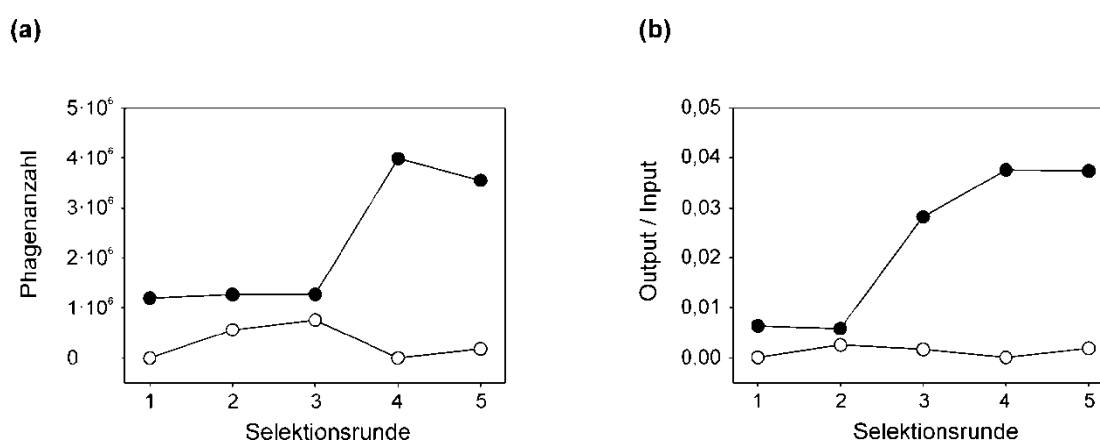


Abbildung 5.18. Verlauf der Phagenanreicherung während der Selektion von $VPE_{Bibo-d19}$ gegen VPK. Der Phagentiter (a) gibt die Anzahl der nach jeder Runde selektierten Phagen an. Das Output/Input-Verhältnis (b) stellt den Quotienten aus den selektierten Phagen (Output) und den in der jeweiligen Runde eingesetzten Phagen (Input) dar. Die Negativkontrolle ist weiß, die Selektion gegen VPK schwarz dargestellt.

Von den nach fünf *panning*-Runden selektierten Phagen wurden 10 Klone ausgewählt und jeweils der das Fusionspeptid codierende DNA-Abschnitt sequenziert. Jeder der ausgewählten Klone wies dabei die intakte, VPE-codierende DNA-Sequenz auf, wobei es sich bei den Aminosäuren in den variablen Positionen jeweils um für *coiled coil*-Peptide typische Reste handelte (Tabelle 5.12).

Während in der d'_{19} -Position aller getesteten Klone wie im VPE-Wildtyp stets Leucin gefunden wurde, weichen die Aminosäuren der übrigen variablen Positionen vom ursprünglichen Design ab. Die β -verzweigte Aminosäure Valin, welche die **a**-Positionen in VPE bildet, konnte in keinem der untersuchten Klone gefunden werden. Stattdessen fanden sich auch in diesen Positionen Leucin, sowie die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin. Leucin stellt die im hydrophoben Kern von *coiled coil*-Peptiden mit Abstand am häufigsten zu findende Aminosäure dar und stabilisiert vermutlich auch in diesem Fall die Struktur der entstehenden VPK/ $VPE_{\text{selekt.}}$ -Heteromere stärker als Valin. Das Auftreten der aromatischen Aminosäuren erscheint aufgrund der zu erwartenden sterischen Hinderung verwunderlich. Möglicherweise sind hierfür ähnliche Effekte verantwortlich wie für die bei den in Position **a**₁₆ substituierten VPK-Varianten

beobachtete Selektion von Tyrosin und Phenylalanin (5.2.4). Möglich wäre demnach auch in diesem Fall eine Kation- π -Wechselwirkung zwischen der aromatischen Seitenkette dieser Aminosäuren und der Aminogruppe einer gegenüberliegenden Lysinseitenkette (in Position g_8 bzw. g_{15} von VPK). Position e'_{20} erwies sich als vergleichsweise flexibel, wobei bis auf zwei Ausnahmen (Gln, Lys) auch hier Aminosäuren mit hydrophober Seitenkette gefunden wurden, von denen Leucin am häufigsten vertreten war.

Tabelle 5.12. Aminosäureverteilung in den variablen Positionen der gegen VPK (Leu_{19}) selektierten VPE-Varianten.

Häufigkeit der gefundenen Sequenz	Position a'_{16}	Position d'_{19}	Position e'_{20}	Position a'_{23}
2×	Leu	Leu	Leu	Tyr
1×	Leu	Leu	Leu	Phe
1×	Leu	Leu	Tyr	Tyr
1×	Leu	Leu	Gln	Tyr
1×	Tyr	Leu	Lys	Leu
2×	Tyr	Leu	Leu	Leu
1×	Phe	Leu	Leu	Leu
1×	Leu	Leu	Leu	Leu

5.3.3 Selektion bevorzugter Wechselwirkungspartner für Glutaminsäure in Position d_{19}

Bevor mit der Selektion geeigneter VPE-Mutanten als Wechselwirkungspartner der fluorierten Aminosäuren DfeGly, DfpGly und TfeGly in Position d_{19} begonnen wurde, sollte das Screeningsystem zunächst mit natürlichen Aminosäuren getestet werden, die gewöhnlich nicht innerhalb des hydrophoben Kerns zu finden sind. Als Beispiel wurde hierfür Glutaminsäure gewählt, welche aufgrund der negativ geladenen Seitenkette nicht den üblichen Anforderungen einer Aminosäure der d -Position eines *coiled coil* entspricht. Anhand von CD-spektroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Peptid VPK-E₁₉ im Gegensatz zum VPK-Wildtyp weder in isolierter Form, noch in Gegenwart äquimolarer Mengen VPE in der Lage ist, eine stabile *coiled coil*-Struktur auszubilden (Abbildung 5.19).

Unter Verwendung der ausgearbeiteten Selektionsprozedur sollte versucht werden, aus der Bibliothek VPE_{Bibo-d19} VPE-Varianten zu isolieren, die in Kombination mit VPK-E₁₉ ein heteromeres *coiled coil* ausbilden. Nachdem ein erster Selektionsversuch unter Verwendung des für den VPK-Wildtyps genutzten *panning*-Protokolls zu keiner

Phagenanreicherung führte, wurde die Konzentration des während der Waschschriffe verwendeten Detergenz reduziert, um auch die Ausbildung weniger stabiler *coiled coil*-Strukturen zu ermöglichen. Für die letztendlich erfolgreiche Selektion wurde die Waschprozedur während der ersten vier Selektionsrunden bei einer Tween20-Konzentration von 0,1% durchgeführt. Erst in der fünften und gleichzeitig letzten Selektionsrunde wurde die Konzentration des Detergenz auf 0,2% erhöht.

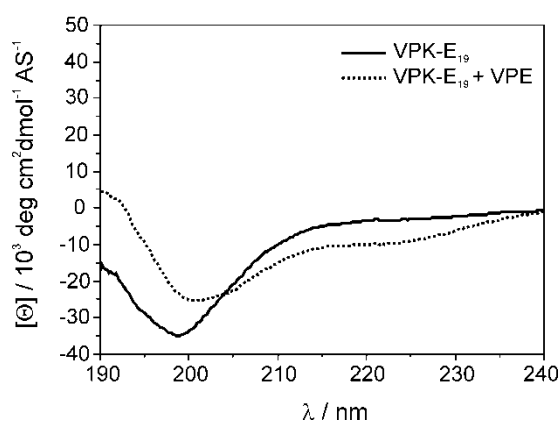


Abbildung 5.19. CD-Spektren von VPK-E₁₉ in isolierter Form sowie in einer äquimolaren Mischung von VPK-E₁₉ und VPE. Die Spektren wurden jeweils bei 20 °C in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und einer Gesamtpeptidkonzentration von 20 μM aufgenommen.

Dieses Protokoll führte zu einer deutlichen Phagenanreicherung, wobei die Titer der Negativkontrolle konstant niedrig blieben und eine unspezifische Anreicherung ausgeschlossen werden konnte. Die Sequenzierung einiger Klone bestätigte die spezifische Selektion aufgrund der *coiled coil*-Wechselwirkung. Wie Tabelle 5.13 zu entnehmen ist, wurden in 9 getesteten Klonen nur zwei unterschiedliche Phänotypen gefunden. Die jeweiligen Genotypen wiesen jedoch eine deutlich höhere Variation auf, womit eine zufällige Anreicherung, beispielsweise durch die Verunreinigung der verwendeten *E.coli*-Kultur auszuschließen ist. Vielmehr sprechen die Ergebnisse für eine spezifische Selektion dieser VPE-Variante als Wechselwirkungspartner für VPK-E₁₉.

Tabelle 5.13. Sequenzierungsergebnisse der Selektion gegen VPK-E₁₉.

Häufigkeit der gefundenen Sequenz	Position a' ₁₆	Position d' ₁₉	Position e' ₂₀	Position a' ₂₃
8×	Leu	Leu	Leu	Lys
1×	Leu	Leu	Met	Lys

In den Positionen \mathbf{a}'_{19} und \mathbf{d}'_{19} sowie \mathbf{e}'_{20} der getesteten Klone fand sich mit einer Ausnahme (Met in \mathbf{e}'_{20}) die Aminosäure Leucin, während für Position \mathbf{a}'_{23} ausschließlich Lysin selektiert wurde. Da Aminosäuren mit geladener Seitenkette nur selten in den Positionen des hydrophoben Kerns zu finden sind und gewöhnlich zu einer starken Destabilisierung der *coiled coil*-Struktur führen, hängt die Selektion von Lysin offensichtlich mit der negativ geladenen Seitenkette der Glutaminsäure in Position \mathbf{d}_{19} des angebotenen VPK-Peptids zusammen.

Um zu überprüfen, ob VPK-E₁₉ zusammen mit der selektierten VPE-Variante VPE-L₁₆L₂₀K₂₃ eine heteromere *coiled coil*-Struktur ausbildet, wurden beide Peptide synthetisiert und CD-spektroskopisch untersucht. Wie die erhaltenen Spektren zeigen, liegen VPK-E₁₉ und VPE-L₁₆L₂₀K₂₃ in isolierter Form jeweils ungefaltet vor, während das CD-Spektrum einer äquimolaren Mischung beider Peptide den für eine α -helikale Struktur charakteristischen Verlauf zeigt (Abbildung 5.20 a). Die geladenen Aminosäuren innerhalb des hydrophoben Kerns verhindern demnach jeweils die Bildung von Homomeren, ermöglichen aber die Bildung von Heteromeren. Die Bedeutung des Lysin-Restes in Position \mathbf{a}'_{23} für die Ausbildung dieser heteromeren *coiled coil*-Struktur konnte durch ein zweites Experiment verdeutlicht werden. Anstelle von Lysin wurde die hydrophobe Aminosäure Leucin in Position \mathbf{a}'_{23} einer zweiten VPE-Variante eingebaut, welche in den übrigen Positionen dem im Phage Display selektierten Peptid VPE-L₁₆L₂₀K₂₃ entsprach und als VPE-L₁₆L₂₀L₂₃ bezeichnet wurde (Tabelle 5.14).

Tabelle 5.14. Aminosäuresequenz des Peptids VPK-E₁₉, der mittels Phage Display selektierten VPE-Variante VPE-L₁₆L₂₀K₂₃ sowie der Kontrollpeptide VPE und VPE-L₁₆L₂₀L₂₃.

Peptid	Sequenz
VPK-E ₁₉	Abz-KVSALKEKVASLKEKVS AEKEEVASLEEKVSALK-OH
VPE	Abz-EVSALEKEVASLEKEVSALEKKVASLKKEVSALE-OH
VPE-L ₁₆ L ₂₀ K ₂₃	Abz-EVSALEKEVASLEKELSALLKKKASLKKEVSALE-OH
VPE-L ₁₆ L ₂₀ L ₂₃	Abz-EVSALEKEVASLEKELSALLKKLASLKKEVSALE-OH

Im Gegensatz zu VPE-L₁₆L₂₀K₂₃ liegt diese VPE-Variante aufgrund der höheren Hydrophobie sowie dem Fehlen der positiv geladenen Aminosäure innerhalb des hydrophoben Kerns in isolierter Form als *coiled coil* vor. Eine 1:1-Mischung aus VPK-E₁₉ und VPE-L₁₆L₂₀L₂₃ zeigt ebenfalls ein CD-Spektrum dessen Verlauf für das Vorliegen einer helikalen Struktur spricht. Allerdings deuten hier das Minimum bei 205 nm sowie das im Verhältnis geringer ausgeprägte Minimum bei 222 nm auf das gleichzeitige Vorliegen von einer helikal gefalteten und einer ungefalteten Peptidspezies hin. Tatsächlich entspricht die Kurve, welche sich durch Addition der beiden CD-Einzelspektren von VPK-E₁₉ und VPE-L₁₆L₂₀L₂₃

ergibt exakt dem gemessenen CD-Spektrum einer äquimolaren Mischung beider Peptide (Abbildung 5.20 b).

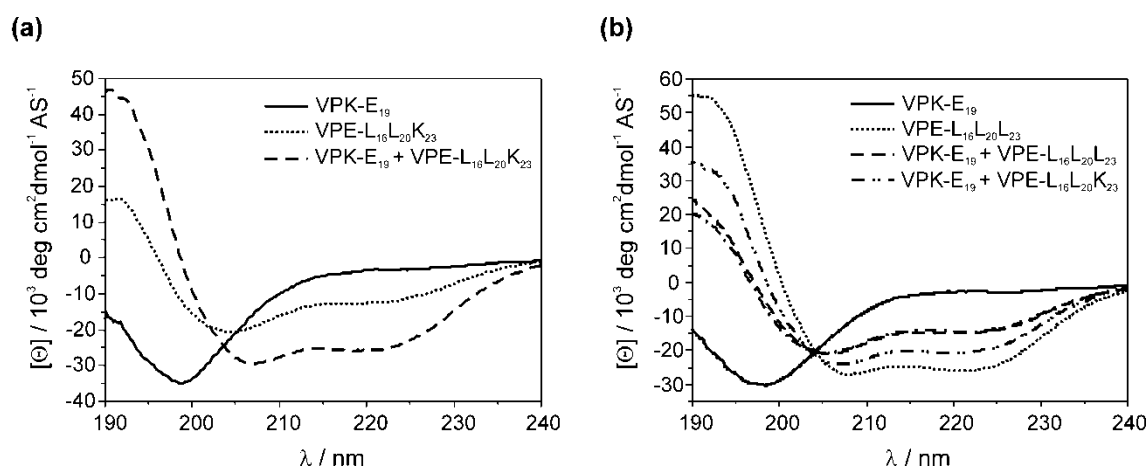


Abbildung 5.20. CD-Spektren von VPK-E₁₉ in isolierter Form sowie in einer äquimolaren Mischung mit verschiedenen VPE-Varianten in Gegenwart der mittels Phage Display selektierten VPE-Variante VPE-L₁₆L₂₀K₂₃. (a) und in Gegenwart des Kontrollpeptids VPE-L₁₆L₂₀L₂₃ (b). Die Kurve (— · —) wurde durch Mittelung der Einzelspektren der Peptide VPK-E₁₉ und VPE-L₁₆L₂₀L₂₃ erhalten. Alle Spektren wurden bei 20 °C in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und einer Gesamtpeptidkonzentration von 20 μM aufgenommen.

Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass es in dem Gemisch beider Peptide nicht zur Ausbildung einer heteromeren Struktur kommt. Stattdessen scheinen beide Peptide unabhängig voneinander unterschiedlich strukturiert vorzuliegen, wobei VPE-L₁₆L₂₀L₂₃ eine *coiled coil*-Struktur ausbildet und VPK-E₁₉ als *random coil* vorliegt. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass der positiv geladenen Lysin-Seitenkette in Position a'₂₃ eine entscheidende Bedeutung bei der Ausbildung von *coiled coil*-Heteromeren mit VPK-E₁₉ zukommt. Darüberhinaus zeigen diese Ergebnisse die hohe Spezifität der *coiled coil*-Bildung zwischen VPK-E₁₉ und VPE-L₁₆L₂₀K₂₃.

Die Analyse der CD-Spektren bei unterschiedlichen Verhältnissen von VPK-E₁₉ und VPE-L₁₆L₂₀K₂₃ zeigte, dass der geringste Wert für $\Theta_{222\text{nm}}$, und damit die höchste Helizität, bei einem 1:1 Verhältnis der beiden Peptide beobachtet wird. Da beide Peptide in isolierter Form ungefaltet vorliegen, spricht diese Beobachtung für die Bildung von Dimeren oder Tetrameren. Die Ausbildung von Trimeren scheint hingegen nicht zu erfolgen, da in diesem Fall der niedrigste $\Theta_{222\text{nm}}$ -Wert bei einem 1:2-Verhältnis von VPK-E₁₉ und VPE-L₁₆L₂₀K₂₃ (bzw. VPE-L₁₆L₂₀K₂₃ und VPK-E₁₉) beobachtet werden sollte (Abbildung 5.21 a).

Mittels analytischer Ultrazentrifugation wurde versucht, den Oligomerisierungsgrad der VPK-E₁₉/VPE-L₁₆L₂₀K₂₃-Heteromere exakt zu bestimmen. Die experimentelle Bestimmung der Molmasse der Heteromere über die Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit ergab einen Wert von 8385 g/mol (Abbildung 5.21 b). Dieser Wert liegt etwas über der für

ein Dimer erwarteten Molmasse von 7623.4 g/mol, aber deutlich unter der berechneten Masse eines Trimers (11400 g/mol). Die Auswertung des Sedimentationsgleichgewichts bei 35000 rpm ergab ähnliche Werte und lieferte in Abhängigkeit der verwendeten Auswertungssoftware eine Molmasse von 8092 g/mol (WINNONLIN) bzw. 8433 g/mol (M-Star¹⁸²).

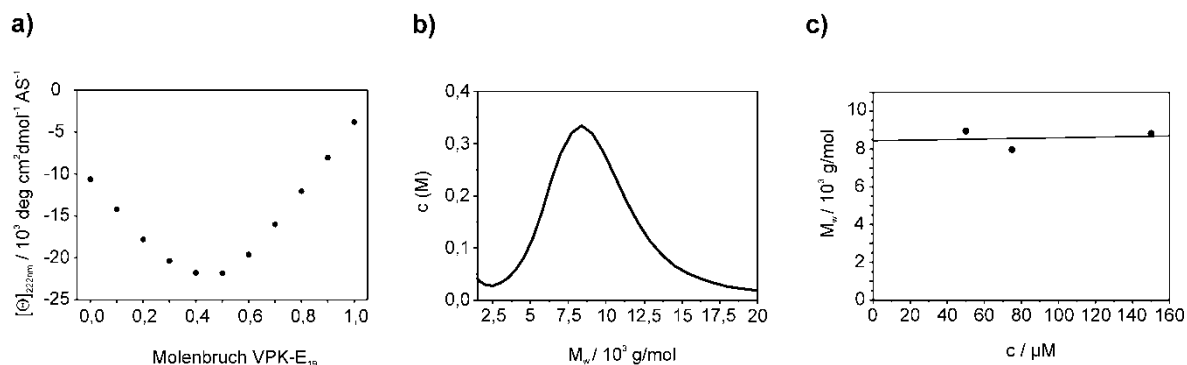


Abbildung 5.21. (a) Darstellung der bei unterschiedlichen Verhältnissen von VPK-E₁₉ und VPE-L₁₆L₂₀K₂₃ gemessenen molaren Elliptizität bei 222 nm. Die Aufnahme der Daten erfolgte in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bei einer Gesamtpeptidkonzentration von 20 μM . (b) Verteilung der bei 60000 rpm und 50 μM Gesamtpeptidkonzentration ermittelten molaren Masse des VPK-E₁₉/VPE-L₁₆L₂₀K₂₃-Heteromers. (c) Konzentrationsabhängigkeit der molaren Masse des VPK-E₁₉/VPE-L₁₆L₂₀K₂₃-Heteromers bei 35000 rpm.

Die beste Übereinstimmung mit dem für ein Dimer erwarteten Wert lieferte dabei das Programm WinNonlin. Hierbei wurde das beste Ergebnis unter Verwendung eines Fits erzielt, der von einem Gleichgewicht zwischen Di- und Tetrameren ausgeht. Ein schnelles Gleichgewicht zwischen beiden Oligomeren könnte die Abweichung von dem für ein Dimer erwartetem Wert erklären und würde ebenfalls mit dem Ergebnis des Titrationsexperiments übereinstimmen.

Aufgrund der jeweils nur geringfügig höheren, experimentell bestimmten Werte ist jedoch anzunehmen, dass VPK-E₁₉/VPE-L₁₆L₂₀K₂₃-Dimere die überwiegende Spezies in einem solchen Gleichgewicht darstellen. Insgesamt kann anhand der vorliegenden Daten davon ausgegangen werden, dass die von VPK-E₁₉ und VPE-L₁₆L₂₀K₂₃ ausgebildete *coiled coil*-Struktur überwiegend als Dimer vorliegt. Die Anordnung als Dimer, sowie die Notwendigkeit von Lys₂₃ für der Ausbildung einer heteromeren *coiled coil*-Struktur sprechen für die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen der Aminofunktion der Lysinseitenkette und der Carboxylfunktion der Seitenkette der Glutaminsäure in Position **d**₁₉ von VPK-E₁₉, welche die Bildung einer heteromeren *coiled coil* Struktur ermöglicht. MD-Simulationen unterstützen diese Vermutung und deuten ebenfalls auf das Vorliegen einer Salzbrücke zwischen Glu₁₉ und Lys₂₃ hin. Der Abstand zwischen dem Carbonylsauerstoff der Glutamatseitenkette und dem Amidstickstoff der Lysinseitenkette

beträgt weniger als 3 Å (95,9% der Simulationszeit). Darüberhinaus ergab die Analyse der Energiewerte für die einzelnen Aminosäuren, dass Lys₂₃ mit -5,3 kcal/mol den mit Abstand größten Anteil zur Stabilisierung der *coiled coil*-Struktur besteuert. Die übrigen mutierten Aminosäurepositionen a'₁₆ und e'₂₀ tragen mit jeweils negativen Energiewerten ebenfalls stark zur Stabilität des Dimers bei.¹⁸³ Zusätzliche CD-Experimente haben diese Beobachtung bestätigt und gezeigt, dass allein die Substitution von Val₂₃ durch Lys₂₃ nicht zur Ausbildung eines *coiled coil*-Dimers zwischen VPK-E₁₉ und VPE-K₂₃ führt.

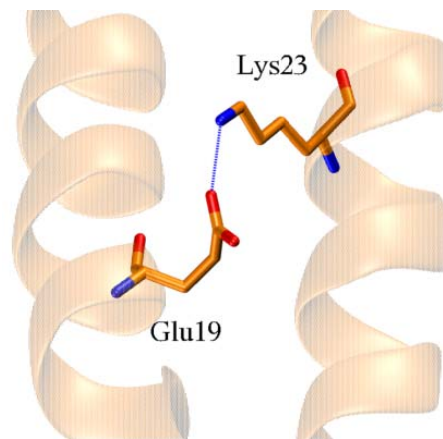


Abbildung 5.22. Modell der zwischen den Seitenketten von der Glu₁₉ in VPK-E₁₉ und Lys₂₃ in VPE-L₁₆L₂₀K₂₃ vermuteten Salzbrücke.¹⁸³

Die beschriebenen Experimente zeigen, dass die im Phage Display selektierte VPE-Variante den optimalen Wechselwirkungspartner für VPK-Glu₁₉ darstellt und als einzige der untersuchten VPE-Varianten die Bildung von *coiled coil*-Heteromeren ermöglicht. Bemerkenswert hierbei ist die Salzbrücke innerhalb des hydrophoben Kerns der VPK-E₁₉/VPE-L₁₆L₂₀K₂₃-Heteromere, welche eine sehr spezifische Wechselwirkung zwischen beiden Peptiden ermöglicht. Obwohl in einem parallelen *coiled coil* die gegenüberliegenden d'₁₉-Position den direkten Wechselwirkungspartner für die Aminosäure in Position d₁₉ darstellt, wurde in VPE nicht Leu₁₉, sondern Val₂₃ zu Lysin mutiert. Die versetzte Anordnung beider Aminosäuren erlaubt dabei die Ausbildung einer Salzbrücke ohne die *coiled coil*-Struktur zu beeinträchtigen (Abbildung 5.22)

Der Einbau von Salzbrücken innerhalb des hydrophoben Kerns für das Design spezifisch wechselwirkender *coiled coil*-Heteromere wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben.^{184,185,186} Dabei befanden sich die geladenen Aminosäuren jeweils in den sich direkt gegenüberliegenden Positionen des hydrophoben Kerns. Aus sterischen Gründen wurden dabei basische Aminosäuren mit verkürzter Seitenkette verwendet, um die Wechselwirkung mit einer gegenüberliegenden Glutamat- oder Aspartat-Seitenkette zu ermöglichen ohne die Ausbildung der *coiled coil*-Struktur durch

den hohen Raumanpruch der Lysin- und Arginin-Seitenketten zu beeinträchtigen. Die Anwendung dieses Designprinzips ist aufgrund der verwendeten nicht-kanonischen Aminosäuren hauptsächlich auf Peptide beschränkt, welche durch chemische Synthese dargestellt werden können. Im Gegensatz dazu konnte durch die Anwendung der im Rahmen dieser Promotion entwickelten Selektionsprozedur ein *coiled coil*-Heteromer entwickelt werden, dessen spezifische Wechselwirkung ausschließlich auf kanonischen Aminosäuren beruht.

Durch die Selektion von VPE-L₁₆L₂₀K₂₃ als Wechselwirkungspartner für VPK-E₁₉ konnte das Potential des eingesetzten Screeningsystems demonstriert werden, hochspezifische Wechselwirkungspartner für Aminosäuren zu selektieren, die gewöhnlich nicht in den **a**- und **d**-Positionen von *coiled coil*-Peptiden auftreten. Darüberhinaus liefert das selektierte Heterodimer ein vielversprechendes Design-Prinzip für die Entwicklung von *coiled coil*-Peptiden, deren spezifische Heteromerisierung unabhängig von den **e**- und **g**-Positionen erfolgt, wodurch die Einführung zusätzlicher struktureller und funktioneller Eigenschaften ermöglicht wird.

5.3.4 Die Selektion bevorzugter Wechselwirkungspartner für DfeGly, DfpGly und TfeGly in Position **d**₁₉

Nachdem das Screening für Position **d**₁₉ mit der Bibliothek VPE_{Bibo-d19} erfolgreich getestet wurde, sollten mit Hilfe der entwickelten Selektionsmethode die jeweils günstigsten Wechselwirkungspartner für (S)-4,4-Difluorethylglycin (DfeGly), (S)-4,4-Difluorpropylglycin (DfpGly) und (S)-4,4,4-Trifluorethylglycin (TfeGly) in dieser Position ermittelt werden.

Tabelle 5.15. Aminosäuresequenzen der für das Screening verwendeten, in Position **d**₁₉ fluoralkyl-substituierten VPK-Varianten.

Peptid	Sequenz
Bio-VPK-DfeGly ₁₉	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEKVSAD DfeGly KEEVASLEEKVSALK-OH
Bio-VPK-DfpGly ₁₉	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEKVSAD DfpGly KEEVASLEEKVSALK-OH
Bio-VPK-TfeGly ₁₉	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEKVSAT TfeGly KEEVASLEEKVSALK-OH

Die in Position **d**₁₉ substituierten VPK-Varianten (Tabelle 5.15) wurden über das N-terminale Biotin-Label an Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel gebunden und für die Selektion geeigneter Bindungspartner aus der Phagenbibliothek nach dem unter 5.2.2 beschriebenen Protokoll verwendet.

Verglichen mit den VPE-Varianten, welche mit Hilfe der in Position **a**₁₆ fluoralkylsubstituierten VPK-Peptide selektiert wurden, weisen die als Bindungspartner für DfeGly, DfpGly und TfeGly in Position **d**₁₉ selektierten VPE-Varianten eine deutlich höhere Varianz auf. Von jeweils 10 nach dem *panning* sequenzierten Klonen zeigen nahezu alle einen unterschiedlichen Phänotyp (Tabelle 5.16).

Tabelle 5.16. Aminosäureverteilung in den variablen Positionen der gegen VPK-DfeGly₁₆, VPK-DfpGly₁₆ und VPK-TfeGly₁₆ selektierten VPE-Mutanten.

	Häufigkeit der selektierten Sequenz	Position a' ₁₆	Position d' ₁₉	Position e' ₂₀	Position a' ₂₃
VPK	2×	Leu	Leu	Leu	Val
-DfeGly₁₉	1×	Leu	Leu	Ile	Val
	1×	Leu	Leu	Glu	Ile
	1×	Leu	Leu	Thr	Val
	1×	Val	Leu	Gln	Val
	1×	Val	Leu	Val	Ile
	1×	Tyr	Leu	Met	Leu
	1×	Phe	Leu	Met	Leu
VPK	2×	Leu	Leu	Met	Phe
-DfpGly₁₉	1×	Leu	Leu	Met	Tyr
	2×	Leu	Leu	Leu	Tyr
	1×	Leu	Leu	Leu	Phe
	1×	Leu	Leu	Tyr	Tyr
	1×	Leu	Leu	Tyr	Leu
	1×	Leu	Leu	Ile	Leu
VPK	4×	Phe	Leu	Leu	Leu
-TfeGly₁₉	1×	Tyr	Leu	Leu	Leu
	1×	Tyr	Leu	Met	Leu
	1×	Tyr	Leu	Ser	Leu
	1×	Leu	Leu	Ser	Leu
	1×	Leu	Leu	Gln	Leu
	1×	Leu	Leu	Leu	Phe

Trotz der großen Varianz lassen sich jedoch deutliche Tendenzen für die in den einzelnen Positionen bevorzugten Aminosäureseitenketten erkennen. Wie bereits bei den vorangegangenen Experimenten mit VPK und VPK-E₁₉ wurden in den Positionen des hydrophoben Kerns (**a'**₁₆, **d'**₁₉ und **a'**₂₃) ausschließlich Aminosäuren mit hydrophober aliphatischer oder aromatischer Seitenkette selektiert. Die größte Konstanz zeigte sich dabei für Position **d'**₁₉, in der ausschließlich Leucin selektiert wurde. In den beiden

randomisierten **a**-Positionen wurden neben Leucin auch die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin gefunden. Dieses Ergebnis entspricht den Sequenzen, welche als Wechselwirkungspartner für den VPK-Wildtyp (Leu₁₉) selektiert wurden. Lediglich für die VPK-Variante mit DfeGly in Position **d**₁₉ wurden VPE-Varianten als Wechselwirkungspartner selektiert in denen in **a'**₁₆ und **a'**₂₃ die für die **a**-Positionen typischen Aminosäuren mit β -verzweigter, hydrophober Seitenkette (Val, Ile) auftraten. Darüberhinaus enthielten lediglich zwei der für VPK-DfeGly₁₆ selektierten VPE-Varianten aromatische Aminosäuren, während diese in den mit VPK, VPK-TfeGly₁₉ und VPK-DfpGly₁₉ selektierten VPE-Varianten deutlich häufiger auftraten.

In allen selektierten VPE-Peptiden zeigte Position **e'**₂₀ die höchste Varianz. Unterschiede zwischen den für die verschiedenen VPK-Peptide selektierten VPE-Varianten zeigen sich daher hauptsächlich in den beiden **a**-Positionen. Während bei DfeGly₁₉ in den Positionen **a'**₁₆ und **a'**₂₃ Aminosäuren mit aliphatischer Seitenkette bevorzugt werden, scheinen DfpGly₁₉ und TfeGly₁₉ VPE-Varianten zu favorisieren, die in einer der beiden Positionen eine aromatische Seitenkette aufweisen. Als Wechselwirkungspartner für VPK-DfpGly₁₉ wurden Tyrosin und Phenylalanin ausschließlich in Position **a'**₂₃ der entsprechenden VPE-Varianten selektiert, während sie in den gegen VPK-TfeGly₁₉ selektierten VPE-Varianten hauptsächlich in Position **a'**₁₆ zu finden sind. Eine zusammengefasste Darstellung der jeweils favorisierten VPE-Varianten ist in Tabelle 5.17 aufgelistet.

Tabelle 5.17. Zusammenfassung der als Wechselwirkungspartner verschiedener Aminosäuren in Position **d**₁₉ von VPK selektierten VPE-Mutanten.

	Position a' ₁₆	Position d' ₁₉	Position e' ₂₀	Position a' ₂₃
Leu	Leu oder aromatisch	Leu	hydrophob/ polar	aromatisch
VPK-DfeGly₁₉	Leu oder Val	Leu	hydrophob/ polar	Val/Ile oder Leu
VPK-DfpGly₁₉	Leu	Leu	hydrophob/ polar	Leu oder aromatisch
VPK-TfeGly₁₉	Leu oder aromatisch	Leu	hydrophob/ polar	aromatisch oder Leu

Eine ausführliche Interpretation dieser Daten ist aufgrund der relativ hohen Varianz innerhalb der einzelnen Positionen schwierig. Daher wurden die jeweils bevorzugt selektierten VPE-Varianten synthetisiert, um die thermische Stabilität der entsprechenden *coiled coil*-Heteromere zu bestimmen und untereinander zu vergleichen. Aufgrund der hohen Variabilität in Position **e'**₂₀ wurde für diese Position in allen synthetisierten VPE-Varianten Leucin als Vertreter aliphatischer hydrophober Aminosäuren gewählt. Insgesamt wurden vier verschiedene VPE-Varianten synthetisiert und in Kombination mit

den in Position **d**₁₉ substituierten VPK-Varianten untersucht. VPE-L₁₆L₂₀Y₂₃ entspricht dabei den überwiegend für VPE-DfpGly₁₉ und VPE-Y₂₃L₂₀L₂₃ den für VPE-TfeGly₁₉ bevorzugt selektierten VPE-Varianten, während VPE-L₁₆L₂₀ und VPE-L₂₀ die für VPK-DfpGly₁₆ selektierten Sequenzen repräsentieren (Tabelle 5.18).

Tabelle 5.18. Aminosäuresequenzen der synthetisierten VPE-Varianten die als bevorzugte Wechselwirkungspartner für VPK-DfeGly₁₉, VPK-TfeGly₁₉ und VPK-DfpGly₁₉ selektiert wurden.

Peptid	Sequenz
VPE-L ₂₀	Abz-EVSALEKEVASLEKEVSALLKKVASLKKEVSALE-OH
VPE-L ₂₀ L ₂₃	Abz-EVSALEKEVASLEKEVSALLKKLASLKKEVSALE-OH
VPE-L ₁₆ L ₂₀ Y ₂₃	Abz-EVSALEKEVASLEKELSALLKKYASLKKEVSALE-OH
VPE-Y ₁₆ L ₂₀ L ₂₃	Abz-EVSALEKEVASLEKEYSALLKKLASLKKEVSALE-OH

Erwartungsgemäß führten alle der untersuchten VPE-Varianten in Kombination mit VPK sowie den verschieden in Position **d**₁₉ substituierten VPK-Varianten zur Ausbildung stabiler *coiled coil*-Strukturen. Mittels thermischer Denaturierung konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die Stabilität der *coiled coil*-Heteromere in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten VPE-Variante unterscheidet (Tabelle 5.19 + Abbildung 5.23). Als stabilster Wechselwirkungspartner für die drei fluoralkylsubstituierten VPK-Varianten sowie für den VPK-Wildtyp erwies sich dabei VPE-L₁₆L₂₀, wobei der Stabilitätsgewinn für die fluorierten VPK-Peptide mit jeweils ca. 9-10 °C sehr deutlich ist. Während sich jedoch die thermische Stabilität deutlich erhöht, bleibt der Stabilitätstrend unter den substituierten VPK-Peptiden erhalten. Den höchsten Schmelzpunkt weist dabei, wie in Kombination mit dem VPE-Wildtyp, die Kombination mit dem VPK-Wildtyp auf, gefolgt von VPK-DfeGly₁₉, VPK-DfpGly und VPK-TfeGly.

Eine ebenfalls deutliche Erhöhung der thermischen Stabilität konnte für die in Kombination mit VPE-L₂₀ gebildeten *coiled coil*-Heteromere beobachtet werden. Auch hier stimmt der Trend innerhalb der VPK-Varianten prinzipiell mit den Schmelzpunkten der mit dem VPE-Wildtyp ausgebildeten Dimere überein. Zwar ist für VPE-L₂₀ die Kombination mit VPK-DfpGly geringfügig stabiler als mit VPK-DfeGly₁₉, doch ist dieser Unterschied mit 0,3 °C sehr gering, sodass wie für die Kombination mit dem VPE-Wildtyp ($\Delta T_m = 0,1$ °C) davon ausgegangen werden kann, dass beide VPK-Varianten *coiled coil*-Strukturen ähnlicher Stabilität ausbilden. Da sich VPE-L₂₀ lediglich in Position **e'**₂₀ vom VPE-Wildtyp unterscheidet, lassen sich die beobachteten Unterschiede in der thermischen Stabilität der mit den verschiedenen VPK-Varianten gebildeten *coiled coil*-Heteromere ausschließlich auf den Austausch von Glutaminsäure gegen Leucin in dieser Position zurückführen. Die Erhöhung der Schmelzpunkte um jeweils etwa 5 °C zeigt dabei deutlich

den stabilisierenden Effekt, der sich durch die Erweiterung der hydrophoben Grenzfläche zwischen beiden Peptiden ergibt. Die darüberhinausgehende Stabilisierung, welche nach dem zusätzlichen Austausch von Valin in Position α'_{16} gegen Leucin (VPE-L₁₆L₂₀) beobachtet wurde, ist vermutlich auf die höhere Hydrophobie von Leucin im Vergleich zu Valin zurückzuführen. Dabei ergänzen sich die beiden Effekte und erklären die hohen, für VPE-L₁₆L₂₀ beobachteten Stabilitätsgewinne.

Tabelle 5.19. Schmelzpunkte der von VPK-X₁₉ und den selektierten VPE-Varianten gebildeten Heteromere. Die jeweils stabilste Kombination aus VPK-X₁₉ und der entsprechenden VPE-Variante ist grau hinterlegt.

	VPE	VPE-L ₂₀	VPE-L ₁₆ L ₂₀	VPE-Y ₁₆ L ₂₀ L ₂₃	VPE-L ₁₆ L ₂₀ Y ₂₃
VPK	72,4 °C	73,3 °C	74,0 °C	72,2 °C	68,4 °C
VPK-DfeGly ₁₉	60,8 °C	65,7 °C	70,6 °C	58,0 °C	56,8 °C
VPK-DfpGly ₁₉	60,7 °C	66,0 °C	70,0 °C	62,5 °C	61,3 °C
VPK-TfeGly ₁₉	57,8 °C	63,8 °C	67,9 °C	60,3 °C	58,4 °C

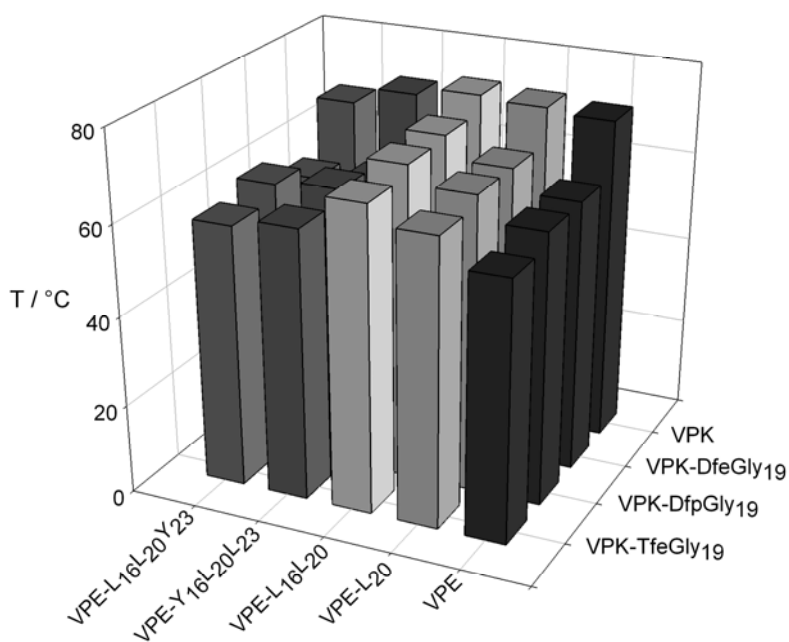


Abbildung 5.23. Vergleichende Darstellung der thermischen Stabilität unterschiedlicher, in Position d_{19} substituierter VPK-Varianten in Kombination mit den jeweils selektierten VPE-Varianten. Die Werte der jeweiligen Schmelzpunkte sind in Tabelle 5.19 aufgeführt.

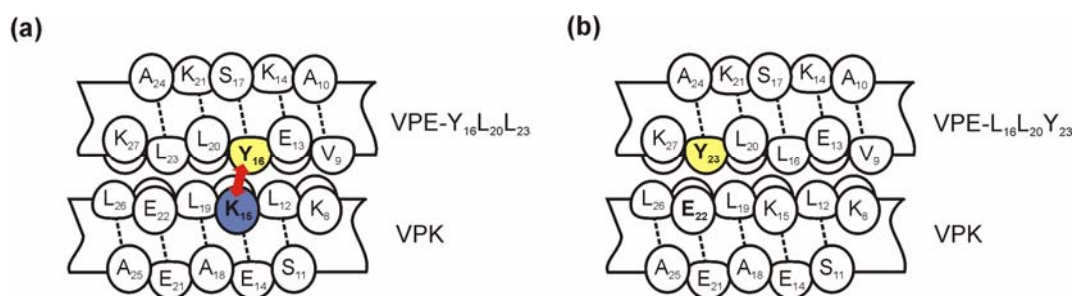


Abbildung 5.24. Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen VPK und VPE-Y₁₆L₂₀L₂₃ (a) und VPE-L₁₆L₂₀Y₂₃ (b). Die vermutete Kation- π -Wechselwirkung zwischen Tyr₁₆ (VPE-Y₁₆L₂₀L₂₃K) und Lys₁₅ (VPK) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

In VPE-L₁₆L₂₀Y₂₃ wird die stabilisierende Wirkung von Leu₁₆ und Leu₂₀ durch den zusätzlichen Austausch von Valin in Position a'₂₃ gegen Tyrosin offensichtlich abgeschwächt. Auch in Kombination mit VPE-Y₁₆L₂₀L₂₃ wurden allgemein deutlich niedrigere Schmelzpunkte beobachtet als in Kombination mit VPE-L₂₀ oder VPE-L₁₆L₂₀.

Für VPK-DfeGly₁₉ stimmt diese Beobachtung gut mit den Ergebnissen des Phage Display überein, da für dieses Zielpeptid nur in zwei von zehn untersuchten VPE-Varianten Tyrosin bzw. Phenylalanin gefunden werden konnten. Für die übrigen VPK-Peptide wurden hingegen mehrere VPE-Varianten mit aromatischen Aminosäuren in Position a'₁₆ bzw. a'₂₃ selektiert, wodurch eine deutlichere Stabilisierung durch VPE-L₁₆L₂₀Y₂₃ sowie VPE-Y₁₆L₂₀L₂₃ zu erwarten gewesen wäre. Desweiteren fällt auf, dass für alle untersuchten VPK-Varianten VPE-Y₁₆L₂₀L₂₃ im Vergleich mit VPE-L₁₆L₂₀Y₂₃ den günstigeren Wechselwirkungspartner darstellt. Die Beobachtung könnte die Theorie von der Ausbildung von Kationen- π -Wechselwirkungen zwischen dem Phenylring der Tyrosin-Seitenkette und eines benachbarten Lysins stützen. In Position a'₁₆ wäre eine solche Wechselwirkung mit der Seitenkette des Lysinrestes in Position g₁₅ der gegenüberliegenden VPK-Variante denkbar. Für die Aminosäure in Position a'₂₃ ist eine solche Wechselwirkung jedoch nicht möglich, da sich in Position g₂₂ Glutaminsäure anstelle von Lysin befindet (Abbildung 5.24). Alternativ ist hier die Ausbildung einer stabilisierenden Wechselwirkung mit Lys₂₂ innerhalb desselben Peptidstrangs möglich, die zur Stabilisierung der Helix beiträgt und dadurch möglicherweise die Bindung an die immobilisierte VPK-Variante während der Selektion erleichtert.

Obwohl die Ausbildung von Kationen- π -Wechselwirkungen durch den Phenylring der Tyrosin- und Phenylalanin-Seitenkette eine mögliche Erklärung für die Selektion dieser Aminosäuren liefert, stehen die ermittelten Schmelzpunkte der einzelnen *coiled coil*-Heteromere in deutlichem Widerspruch zu dem häufigen Auftreten aromatischer Aminosäuren in den jeweils selektierten VPE-Varianten. Eine Ursache hierfür könnte in der durch den Einbau von Leucin in Position e'₂₀ bedingten Änderung des

Oligomerisierungsgrads der entstehenden *coiled coil*-Strukturen liegen.¹⁸⁷ Während aufgrund der entsprechenden räumlichen Verhältnisse (die VPE-Peptide sind an der Phagenoberfläche gebunden; die VPK-Varianten sind an der Streptavidin-Oberfläche verankert) die Bildung höherer Oligomere im Verlauf der Selektion wenig wahrscheinlich ist, könnte die Erweiterung der hydrophoben Grenzfläche zwischen den Helices in Lösung die Ausbildung von Tri- oder Tetrameren induzieren. Zusätzlich dazu könnte der Einbau aromatischer Aminosäuren innerhalb des hydrophoben Kerns ebenfalls zu einer Erhöhung des Oligomerisierungsgrads führen.¹⁸⁸

Zur Überprüfung dieser Vermutung sollte mittels analytischer Ultrazentrifugation die molekulare Masse der verschiedenen *coiled coil*-Heteromere bestimmt werden. Aufgrund der großen Anzahl war es dabei jedoch nicht möglich, alle der sich durch Kombinationen der selektierten VPE-Peptide und den verschiedenen VPK-Varianten ergebenden Proben zu untersuchen. Unter der Annahme, der Einbau von DfeGly, DfpGly oder TfeGly in VPK beeinflusst den Oligomerisierungsgrad der von den entsprechenden VPK-Varianten gebildeten *coiled coil*-Strukturen nicht, wurden daher nur die verschiedenen Heteromere untersucht, welche sich durch Kombination der selektierten VPE-Peptide mit dem VPK-Wildtyp ergeben.

Die für die einzelnen Peptidgemische anhand der Sedimentationsgeschwindigkeit ermittelten Molmassen (Tabelle 5.20) stimmen dabei für alle VPE-Varianten jeweils am besten mit den für tetramere Strukturen berechneten Werten überein. Obwohl diese Ergebnisse dafür sprechen, dass durch die höhere Hydrophobie der im Phage Display selektierten VPE-Varianten der Oligomerisierungsgrad der verschiedenen *coiled coil*-Heteromere erhöht wird, ist unklar, ob diese strukturellen Änderungen bereits während der Selektion auftreten, da es nicht möglich ist den Oligomerisierungsgrad während des Selektionsprozess zu bestimmen.

Tabelle 5.20. Theoretisch berechnete und experimentell bestimmte Molmassen der von VPK und verschiedenen VPE-Varianten gebildeten *coiled coil*-Heteromere.

Peptidgemisch	theoretische Masse des Dimers	theoretische Masse des Tetramers	experimentell bestimmte Masse*
VPK + VPE-L ₂₀	7564 g/mol	15128 g/mol	17447 g/mol
VPK + VPE-L ₁₆ L ₂₀	7578 g/mol	15156 g/mol	15784 g/mol
VPK + VPE-L ₁₆ L ₂₀ Y ₂₃	7643 g/mol	15284 g/mol	14254 g/mol
VPK + VPE-Y ₁₆ L ₂₀ L ₂₃	7653 g/mol	15284 g/mol	15483 g/mol

*Die Bestimmung des molekularen Gewichts der *coiled coil*-Heteromere erfolgte jeweils anhand der Sedimentationsgeschwindigkeit bei 60000 rpm. Alle Experimente erfolgten bei 25 °C in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und einer Gesamtpeptidkonzentration von 50 µM.

Aufgrund der von den Phage Display-Resultaten teilweise abweichenden Ergebnisse der CD-spektroskopischen Untersuchungen, muss jedoch davon ausgegangen werden, dass sich die zwischen den immobilisierten bzw. an der Phagenoberfläche gebundenen Peptide ausgebildeten Strukturen von denen der freien Peptide unterscheiden. Ein Vergleich zwischen den jeweils bevorzugt selektierten Peptidsequenzen und den unter Verwendung der chemisch synthetisierten Peptide durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen ist daher nur eingeschränkt möglich.

Unabhängig von dem unter den unterschiedlichen Bedingungen auftretendem Oligomerisierungsgrad der einzelnen *coiled coil*-Heteromere, lassen sich dennoch einige Rückschlüsse auf die Wechselwirkungsmöglichkeiten der untersuchten Aminosäuren innerhalb des hydrophoben Kerns schließen. So wurden wie bereits für die in α -Position substituierten VPK-Varianten für DfeGly, DfpGly und TfeGly keine spezifischen VPE-Varianten als bevorzugte Wechselwirkungspartner selektiert. Vielmehr zeigten diese fluoralkylsubstituierten Aminosäuren prinzipiell dieselbe Präferenz bezüglich der wechselwirkenden VPE-Variante wie Leucin im VPK-Wildtyp. Wie für die Substitution in Position α_{16} beobachtet, stellen auch hier hydrophobe Aminosäuren in den vier randomisierten Positionen die günstigsten Wechselwirkungspartner für DfeGly, DfpGly und TfeGly dar. Die Unterschiede in Raumanpruch, Hydrophobie und Polarität zwischen den Seitenketten der untersuchten Aminosäuren üben teilweise erheblichen Einfluss auf die *coiled coil*-Stabilität aus.^{167,175} Trotz dieser Unterschiede scheinen DfeGly, DfpGly und TfeGly innerhalb des hydrophoben Kerns der untersuchten *coiled coil*-Struktur die selben Wechselwirkungspartner zu favorisieren wie die gewöhnlich in diesen Positionen auftretenden Aminosäuren Leucin und Valin.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung bevorzugter Wechselwirkungspartner fluoralkylsubstituierter Aminosäuren innerhalb einer natürlichen Proteinumgebung. Hierfür wurde ein Phage Display basiertes Screeningsystem entwickelt, das auf Grundlage der *coiled coil*-Wechselwirkung die Selektion von Peptiden erlaubt, die spezifisch an eine gegebene Zielstruktur binden. Die Verwendung eines *coiled coil*-Dimers als Modell einer natürlichen Proteinumgebung ermöglicht dabei den Einbau nahezu jeder beliebigen Aminosäure mittels Festphasenpeptidsynthese, während die Anwendung der Phage Display-Technik die Herstellung und das Screening umfangreicher Peptidbibliotheken erlaubt.

Für die Entwicklung des Screeningsystems wurde zunächst das parallele *coiled coil*-Heterodimer VPK/VPE entworfen, synthetisiert und strukturell charakterisiert. Nachdem die Ausbildung paralleler Heteromere für dieses *coiled coil* Paar nachgewiesen werden konnte, wurde VPE als pIII-Fusionsprotein an der Oberfläche von M13-Bakteriophagen präsentiert. Mit Hilfe immobilisierter VPK-Peptide konnte anschließend nachgewiesen werden, dass auf Grundlage der nicht kovalenten *coiled coil* Wechselwirkung VPE-präsentierende Phagen gebunden und selektiert werden können. Im nächsten Schritt wurden zwei VPE-Bibliotheken generiert, in denen die zentralen Aminosäurepositionen des hydrophoben Kerns, welche innerhalb der *coiled coil* Struktur mit der nicht natürlichen Aminosäure im VPK-Peptid wechselwirken, randomisiert wurden. Beide VPE-Bibliotheken konnten erfolgreich hergestellt und auf der Oberfläche von M13 präsentiert werden.

Die Selektion geeigneter VPE-Peptide als *coiled coil* Bindungspartner wurde mit Hilfe des VPK-Wildtyps gezeigt und die entsprechende Selektionsprozedur optimiert. Anschließend wurde anhand veränderter VPK-Varianten die Empfindlichkeit des Screeningsystems gegenüber der Änderung einer einzelnen Aminosäureposition innerhalb des Zielpeptids getestet. Dabei konnten sowohl für den Austausch von Valin gegen Asparagin in Position **a₁₆** als auch für die Substitution von Leucin durch Glutaminsäure in Position **d₁₉** des VPK-Peptids deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der selektierten VPE-Varianten beobachtet werden.

Während der Einbau der negativ geladenen Glutaminsäure in einer **d**-Position des hydrophoben Kerns die Dimerisierung von VPK-E₁₉ mit dem VPE-Wildtyp verhindert, konnte mit Hilfe des entwickelten Screeningsystems eine VPE-Variante selektiert werden, die in Kombination mit VPK-E₁₉ eine stabile *coiled coil* Struktur ausbildet. Die strukturelle Untersuchung des selektierten *coiled coil*-Heteromers zeigte eine hohe Spezifität dieser Wechselwirkung. Die versetzte Anordnung der Aminosäuren Lysin (VPE-L₁₆L₂₀K₂₃) und

Glutaminsäure (VPE-E₁₉) erlaubt dabei die Ausbildung einer Salzbrücke innerhalb des hydrophoben Kerns ohne die *coiled coil*-Struktur zu zerstören. Daraus ergibt sich eine hochspezifische Dimerisierungsdomäne, deren Eigenschaften (freie **e**- und **g**-Positionen für die Einführung zusätzlicher Funktionen; Aufbau ausschließlich aus kanonischen Aminosäuren) interessante Anwendungen dieser Struktur für das Proteindesign ermöglichen. Darüberhinaus demonstriert die Selektion dieses *coiled coil*-Paares das Potential des hier entwickelten Phage Display-basierten Screeningsystems, spezifische Wechselwirkungspartner für Aminosäuren zu identifizieren, die innerhalb hydrophober Proteindomänen gewöhnlich nicht auftreten.

Nach der erfolgreichen Testung des Screeningsystems an natürlichen Aminosäuren wurden die fluorierten Aminosäuren (*S*)-4,4-Difluorethylglycin (DfeGly), (*S*)-4,4-Difluorpropylglycin (DfpGly) und (*S*)-4,4,4-Trifluorethylglycin (TfeGly) jeweils in einer zentralen **a**- bzw. **d**-Position von VPK eingebaut. Dadurch konnte der Einfluss der modifizierten Aminosäuren auf die Struktur und die Stabilität des *coiled coil*-Dimers untersucht werden. Mit Hilfe des entwickelten Phage Display-Systems wurden anschließend die jeweils besten Bindungspartner für die modifizierten VPK-Peptide aus der entsprechenden VPE-Bibliothek ermittelt.

Dabei zeigte sich eine deutliche Übereinstimmung der als Wechselwirkungspartner für die fluoralkylsubstituierten VPK-Peptide selektierten VPE-Peptide mit den für den VPK-Wildtyp selektierten VPE-Peptiden. Charakteristisch für diese VPE-Varianten ist die vollständige Besetzung der randomisierten Aminosäurepositionen mit hydrophoben Aminosäuren. Die strukturelle Untersuchung der verschiedenen selektierten *coiled coil*-Heteromere zeigte, dass trotz geringer Unterschiede in der Häufigkeit, mit der die verschiedenen VPE-Varianten als Wechselwirkungspartner für die einzelnen VPK-Peptide selektiert wurden, die modifizierten VPK-Peptide und der VPK-Wildtyp jeweils mit der gleichen VPE-Variante die stabilsten Heteromere ausbilden.

Insgesamt sprechen die bisher gesammelten Ergebnisse dafür, dass die untersuchten Aminosäuren DfeGly, DfpGly und TfeGly innerhalb des hydrophoben Kerns der *coiled coil*-Struktur hydrophobe Aminosäuren als Wechselwirkungspartner bevorzugen. Damit unterscheiden sie sich in ihrem Wechselwirkungsverhalten trotz der Unterschiede in Größe und Polarität ihrer Seitenkette nicht von natürlichen hydrophoben Aminosäuren wie Leucin und Valin.

Ein Hauptmerkmal aller als Wechselwirkungspartner für die untersuchten fluoralkylsubstituierten VPK-Varianten sowie für den VPK-Wildtyp selektierten VPE-Peptide besteht in der Mutation der randomisierten **e**- bzw. **g**-Position. Statt der im VPE-Wildtyp vorkommenden Glutaminsäure wurden in diesen Positionen hauptsächlich Aminosäuren mit hydrophober Seitenkette selektiert. Dieser Austausch führte jeweils zu

einer deutlichen Erhöhung der thermischen Stabilität der einzelnen Heteromere. Gleichzeitig deuten einige experimentelle Ergebnisse daraufhin, dass durch die Ausweitung der hydrophoben Wechselwirkungsfläche der Oligomerisierungsgrad der *coiled coil*-Heteromere verändert wird und somit ein Vergleich zwischen den selektierten Strukturen und dem Wildtyp schwierig ist.

Die Selektion hydrophober Aminosäuren in dieser Position ist offensichtlich wenig spezifisch für die im VPK-Peptid substituierten Aminosäuren und liefert damit wenige Erkenntnisse über das Wechselwirkungsverhalten dieser Reste. Darüberhinaus führt die unspezifische Stabilisierung der *coiled coil*-Heteromere durch hydrophobe Aminosäuren in dieser Position zu einer höheren Toleranz bezüglich der selektierten Aminosäuren in den übrigen variablen Positionen. Dadurch wird die Varianz in den selektierten VPE-Peptiden erhöht und gleichzeitig die Interpretation der Interaktionen der selektierten Aminosäuren mit den nicht-natürlichen Aminosäuren im Zielpeptid erschwert. Durch die Verwendung einer modifizierten VPE-Bibliothek, die ausschließlich randomisierte **a**- und **d**-Position aufweist, könnte die unspezifische *coiled coil*-Stabilisierung durch Ausweitung der hydrophoben Wechselwirkungsfläche verhindert und die Aussagekraft der Selektionsergebnisse erhöht werden. Möglicherweise würde das Screening einer solchen Bibliothek durch die Fixierung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den **e**- und **g**-Positionen zu deutlicheren Unterschieden in den für die unterschiedlich substituierten VPK-Varianten selektierten Peptiden führen. Allerdings würde durch den Verzicht auf die Randomisierung einer potentiellen Wechselwirkungsposition die Auswahl an möglichen Bindungspartnern ebenfalls verringert.

Eine zweite Charakteristik der selektierten VPE-Peptide bestand im relativ häufigen Auftreten aromatischer Aminosäuren innerhalb der variablen Positionen. Die CD-spektroskopische Untersuchung der verschiedenen *coiled coil*-Heteromere hat keinen signifikanten Stabilitätsgewinn durch den Einbau dieser Reste gezeigt. Die Selektion von Tyrosin und Phenylalanin scheint darüberhinaus nicht charakteristisch für die untersuchten Aminosäuren zu sein, sondern ist vermutlich auf Eigenschaften des *coiled coil*-Systems zurückzuführen. Eine mögliche Erklärung besteht hierbei in der Ausbildung von Kationen- π -Wechselwirkungen mit Lysinseitenketten in verschiedenen, nicht randomisierten Positionen von VPK und VPE, welche die Ausbildung der Helices und die Dimerisierung begünstigen könnten. Die Konstruktion einer neuen VPE-Bibliothek unter Ausschluss aromatischer Aminosäuren könnte die Selektion dieser Reste verhindern und würde möglicherweise ebenfalls die Interpretation der Selektionsergebnisse erleichtern. Die Umsetzung dieses Ansatzes ließe sich beispielsweise durch eine Randomisierungsstrategie realisieren, bei der lediglich Adenin, Cytosin und Guanin als erste Base eines jeden Codons zugelassen werden. Dadurch wären die aromatischen Aminosäuren

Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sowie die drei Stopp-Codons aus der Bibliothek ausgeschlossen, während alle übrigen Aminosäuren mit Ausnahme von Cystein durch mindestens ein Basentriplet vertreten sind.

Neben den genannten Veränderungen in der Bibliotheksstrategie würde sich für weiterführende Experimente neben der Untersuchung weiterer fluorierter Aminosäuren eine Variation der Selektionsstrategie anbieten. Interessant wäre beispielsweise, die Bindungsreaktion zwischen der VPE-Bibliothek und den VPK-Varianten in Lösung durchzuführen. Dabei würden die VPK-Peptide durch die geringe Neigung zur Ausbildung von Homomeren als alternative Bindungspartner einen zusätzlichen Selektionsdruck ausüben. Darüberhinaus stellen die Waschschritte nach der Immobilisierung bzw. der Bindungsreaktion einen weiteren Ansatzpunkt dar, um beispielsweise durch Variation der eingesetzten Detergenzien und chaotropen Salze die *coiled coil*-Heteromere bezüglich ihrer Stabilität unter verschiedenen denaturierenden Bedingungen zu selektieren.

7 Experimentelle Beschreibung

7.1 Peptidchemie

7.1.1 Allgemeine Angaben

Chemikalien und Lösungsmittel

Die folgende Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den angegebenen Firmen bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet:

Acetonitril, HPLC gradient grade (*Acros Organics*); Abz-Gly-OH·HCl (*Bachem*) Boc-Abz-OH (*Bachem*); 2-(6-Chlor-1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TCTU, *Fa. Gerhardt*); D(+)-Biotin, 98% (*Acros Organics*); 1,8-Diazabicyclo[5.4.0.]undec-7-en, für die Synthese (*Merck KGaA*); Diethylether, analytical grade (*Fischer Scientific*); Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, p.a. (*Merck KGaA*); 1,2-Ethandithiol, 95% (*Acros Organics*); Fmoc-L-Aminosäuren (*Acros Organics*; *Fa. Gerhardt*; *Novabiochem*); Fmoc-Glu(OtBu)-NovaSyn®-TGA-Harz (0,21 mmol/g, *Novabiochem*); Fmoc-Lys(Boc)-NovaSyn®-TGA-Harz (0,16 mmol/g, *Novabiochem*); Fmoc-3-Nitrotyrosin (*Bachem*); Guanidinhydrochlorid, ≥ 99% (GndHCl, *Fluka*); 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU, *Fa. Gerhardt*); 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt, *Iris Biotech GmbH*); 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt, *Fa. Gerhardt*); Methanol, p.a. (*Sigma-Aldrich*); Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat, > 99% (*Fluka*); Natriumperchlorat, p.a. (*Acros Organics*); N-Methyl-2-Pyrrolidinon (NMP, *Acros Organics*); N,N-Diisopropylcarbodiimid, 99% (DIC, *Acros Organics*); N,N-Diisopropylethylamin, 98+% (DIEA, *Acros Organics*); N,N-Dimethylformamid, p.a. (DMF, *Acros Organics*); Piperidin, 99% extra pure (*Acros Organics*); Trifluoressigsäure, 99% (*Acros Organics*); Trifluoressigsäure, Uvasol® (*Merck KGaA*); Triisopropylsilan, 99% (TIS, *Acros Organics*); Ninhydrin, Phenol und Pyridin wurden der Laborsammlung entnommen.

Die fluorierten Aminosäurebausteine (**S**)-4,4-Difluorethylglycin (DfeGly)¹⁸⁹, (**S**)-4,4-Difluorpropylglycin (DfpGly)¹⁹⁰ und (**S**)-4,4,4-Trifluorethylglycin (TfeGly)¹⁹¹ wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Beate Kocsch nach den in der Literatur angegebenen Vorschriften synthetisiert.

Dichlormethan und Ethanol wurden von VWR bezogen und vor ihrer Verwendung destilliert. Acetanhydrid, 99% (*Acros Organics*) wurde vor der jeweiligen Verwendung

frisch destilliert. Deionisiertes Wasser für die Herstellung von Puffern und HPLC-Laufmittel wurde unter Verwendung eines MilliQ®-AdvantageA10®-Systems (*Millipore*) gewonnen.

Analytische HPLC:

Die qualitative Analyse der synthetisierten Peptide erfolgte unter Verwendung folgender HPLC-Systeme:

- 1) LaChrom-HPLC-System (*Merk-Hitachi*), bestehend aus: einem Interface L-7000; zwei HPLC-Pumpen L-1000; einem Diodenarray-Durchflussdetektor L-7450; einem Hochdruckgradienten-Mixer, einem *Rheodyne* Injektionsventil 7725i, einer 20 µl-Probenschleife, einem Lösungsmitteldegaser L-7612, einem Autosampler L-7200. Die Steuerung der HPLC sowie die Analyse der gemessenen Daten erfolgte mit Hilfe der LaChrom Software Version 4.0.
- 2) Hitachi LaChrom Elite HPLC-System, bestehend aus: zwei HPLC-Pumpen L-2130 inkl. Inline-Degaser; einem Autosampler L-2200 und einem Diodenarray-Durchflussdetektor L-2455. Die Steuerung der HPLC sowie die Analyse der gemessenen Daten erfolgte mit Hilfe der Software EZChrom Elite Version 3.1.7.

Folgende analytische RP-HPLC-Säulen wurden verwendet: *Trentec* C4 (300) Reprosil-Pur 5 µm (250 mm x 4.6 mm); *Vydac* Protein C4 10 µM (250 mm x 4.0 mm); *Phenomenex* Luna C8(2) 5 µM (250 mm x 4,6 mm); *Phenomenex* Luna C8(2) 10 µM (250 mm x 4.6 mm).

Die HPLC-Läufe wurden bei einer Flussrate von 1 ml/min des jeweiligen Laufmittelgemisches unter Verwendung des folgenden Gradienten durchgeführt:

0 min:	5% Laufmittel B
30 min:	70% Laufmittel B
31 min:	100% Laufmittel B
35 min:	100% Laufmittel B
36 min:	5% Laufmittel B
40 min:	5% Laufmittel B

Laufmittel A: 99,9% H₂O + 0,1% TFA Uvasol®; Laufmittel B: 99,9% Acetonitril + 0,1% TFA Uvasol®

Präparative HPLC:

Die Reinigung der synthetisierten Peptide erfolgte mit Hilfe eines *Knaur* Smartline Hochdruckgradienten System, bestehend aus: zwei Pumpen Smartline 1000, Smartline Manager 5000 Interface, variablem UV-Detektor 2500, Injektionsventil, Hochdruckgradienten-Mischkammer, 5 ml-Probenschleife.

Es wurde mit einer Flussrate von 20 ml/min unter Verwendung der für die analytische HPLC beschriebenen Laufmittel gearbeitet. Die Trennung erfolgte auf den präparativen RP-Säulen *Vydac* Protein C4 10 µm (250 mm x 22 mm) und *Phenomenex* Luna C8 10 µm (250 mm x 21.2 mm). Die Detektion erfolgte bei 220 nm bzw. 320 nm für Abz-markierte Peptide. Die Reinigung der unterschiedlichen VPK- und VPE-Varianten erfolgte unter Verwendung des folgenden Gradienten:

0 min:	5% Laufmittel B
30 min:	70% Laufmittel B
32 min:	100% Laufmittel B
35 min:	100% Laufmittel B
38 min:	5% Laufmittel B
40 min:	5% Laufmittel B

Massenspektrometrie:

Die Identifizierung der synthetisierten Peptide erfolgte mittels ESI-ToF-Massenspektrometrie. Die Molekularmasse der Peptide wurde mit einem LC-ESI-MS 6210-Spektrometer der Firma *Agilent* (USA) bestimmt. Als Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus gleichen Anteilen von Wasser und ACN mit 1 % Essigsäure verwendet, die Flussrate betrug 0,4 ml/min.

7.1.2 Peptidsynthese

Alle Peptide wurden an der festen Phase nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie¹⁹² unter Verwendung der folgenden Aminosäurederivate synthetisiert:

Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Glu(OtBu)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH

7.1.2.1 Automatisierte Festphasensynthese

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle Synthesen unter Verwendung eines SyroXP-1 Peptidsynthese-Roboters (*MultiSynTech GmbH*) im 0,05 mmol-Maßstab nach dem in Tabelle 7.1 angegebenen Syntheseprotokoll durchgeführt.

Aminosäurekupplung: die Kupplung der Aminosäurederivate erfolgte unter Verwendung der Aktivierungsreagenzien TBTU oder TCTU und HOBt. Das Harz wurde mit jeweils vier Äquivalenten TBTU (TCTU), HOBt und dem entsprechenden Aminosäurederivat sowie 8 Äquivalenten DIEA in DMF 30 min geschüttelt. Darüber hinaus enthielt die Reaktionslösung Natriumperchlorat (0,23M), um mögliche Aggregationsprozesse während der Synthese zu verhindern. Nach dem Ende der Reaktion wurde das Harz einmal mit 4 ml DMF gewaschen und die Kupplung unter denselben Bedingungen wiederholt. Nachdem das Harz dreimal mit jeweils 4 ml DMF gewaschen wurde erfolgte die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe.

Tabelle 7.1. Verwendetes Protokoll der automatisierten Festphasenpeptidsynthese.

	Verfahrensschritt	Reagenzien	Dauer
Kupplung der ersten Aminosäure	Harz vorquellen	4 ml DMF	2 x 15 min
	Fmoc-Abspaltung	2 ml 2% DBU, 2% Piperidin in DMF	2 x 5 min
	Waschen	4 ml DMF	6 x 1 min
	Aminosäurekupplung	4 Äq. Fmoc-Xaa-OH und HOBt in DMF (0,5 M) 4 Äq. TCTU in DMF (0,33 M) 8 Äq. DIEA in NMP	30 min
	Waschen	4 ml DMF	1 min
Kupplung aller weiteren Aminosäuren	Aminosäurekupplung	4 Äq. Fmoc-Xaa-OH und HOBt in DMF (0,5 M) 4 Äq. TCTU in DMF (0,33 M) 8 Äq. DIEA in NMP	30 min
	Waschen	4 ml DMF	3 x 1 min
	Fmoc-Abspaltung	2 ml 2% DBU, 2% Piperidin in DMF	2 x 5 min
	Waschen	4 ml DMF	6 x 1 min

Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe: Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen wurde das Harz viermal für jeweils 5 min mit 2 ml 2% DBU, 2% Piperidin in DMF geschüttelt. Nach der Reaktion wurde das Harz sechsmal für jeweils eine Minute mit je 4 ml DMF gewaschen. Nach der Fmoc-Abspaltung erfolgte der nächste Kupplungsschritt bzw. nach der letzten Synthesestufe die Abspaltung vom Harz sowie die Entfernung der Seitenketten-schutzgruppen.

Abspaltung der Seitenschutzgruppen und Abspaltung vom Harz: Nach dem Abschluss der Synthese wurde das Harz viermal mit jeweils 5 ml DCM gewaschen, in eine 10 ml PP-Filterspritze überführt und zusammen mit 1,8 ml TFA, 0,2 ml TIS und 20 µl H₂O geschüttelt. Nach drei bis vier Stunden wurde die Peptidlösung filtriert und das Harz zweimal mit je 1 ml TFA sowie zweimal mit je 2 ml DCM gewaschen. Die Lösungen wurden in einem 100 ml-Rundkolben vereinigt und das DCM sowie der größte Teil der TFA mit Argon abgeblasen. Nach dem die Lösung auf 1-2 ml eingengt wurde, wurde das Peptid durch die Zugabe von 100 ml gekühltem Diethylether gefällt. Nach mindestens einer Stunde bei -20°C wurde das ausgefallene Peptid zentrifugiert, getrocknet und mittels präparativer HPLC gereinigt.

Die Abspaltung biotynlierter Peptide erfolgte mit 1,8 ml TFA, 150 µl TIS, 150 µl EDT und 20 µl H₂O nach demselben Protokoll.

7.1.2.2 Manuelle Aminosäurekupplung

Der Einbau der fluorierter Aminosäurebausteine, der jeweils darauf folgenden Aminosäure sowie von Boc-Abz-OH und D-(+)-Biotin erfolgte manuell in 10 ml PP-Filterspritzen.

Aminosäurekupplung: Die zu kuppelnde Aminosäure wurden mit DIC und HOAt (jeweils ein Äquivalent bezogen auf die zu kuppelnde Aminosäure) ohne die Zugabe einer Base in 2 ml DMF aktiviert. Nach 5-10 min Voraktivierung wurde die Reaktionslösung in die das Harz enthaltende Filterspritze aufgezogen und der Reaktionsansatz eine Stunde geschüttelt. Nach dem Ablauf der Reaktionszeit wurde das Harz einmal mit 4 ml DMF gewaschen und die Kupplung unter denselben Bedingungen wiederholt. Die Kupplung der fluorierten Aminosäuren erfolgte jeweils mit einem 1,5-fachen Überschuss, die der übrigen Aminosäuren mit einem 4-fachen Überschuss an Aminosäure und Kupplungsreagenzien. Der Erfolg der Aminosäurekupplung wurde mittels Kaiser-Test überprüft und diese im Fall eines positiven Tests wiederholt. Nicht acylierte N-Termini

wurden mit Acetanhydrid inaktiviert, das Harz viermal mit DMF gewaschen und mit der Fmoc-Abspaltung fortgefahren.

Die Kupplung von D-(+)-Biotin erfolgte mit TBTU und HOBt (jeweils ein Äquivalent bezogen auf das Biotin) und der Zugabe von DIEA als Base (zwei Äquivalente bezogen auf das Biotin) in 3 ml NMP als Lösungsmittel für jeweils 1 h. Die Reaktion wurden zweimal mit jeweils 4-fachem Überschuss D-(+)-Biotin durchgeführt.

Acetanhydrid-capping: Die Inaktivierung nicht acylierter Aminogruppen erfolgte in 10 ml 10% Acetanhydrid (frisch destilliert) + 10% DIEA in DMF. Nach 10 min wurde die Flüssigkeit abgesaugt, das Harz einmal mit 1 ml DMF gewaschen und der Vorgang zweimal wiederholt. Im Anschluss wurde das Harz sechsmal je eine Minute mit 5 ml DMF sowie dreimal eine Minute mit 5 ml DCM gewaschen.

Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe: Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen erfolgte viermal für jeweils 5 min mit 2 ml 2% DBU, 2% Piperidin in DMF (4 ml). Anschließend wurde das Harz sechsmal mit jeweils 5 ml DMF gewaschen und mit der nächsten Aminosäurekupplung fortgefahren.

Abspaltung der Mtt-Schutzgruppe: Das Harz wurde dreimal je eine Minute mit 5 ml DCM gewaschen und anschließend sechsmal für jeweils 2 min mit 3 ml DCM/TFA/TIS (94:1:5) geschüttelt. Nach der Abspaltung wurde fünfmal je eine Minute mit 5 ml DCM sowie dreimal je eine Minute mit 5 ml DMF gewaschen.

Kaiser-Test¹⁹³: Eine kleine Probe des Harzes wurde dreimal mit Ethanol gewaschen und mit jeweils zwei Tropfen der folgenden Lösungen versetzt: Lösung 1) 5g Ninhydrin in 100 ml Ethanol; Lösung 2) 80g Phenol in 20 ml Ethanol; Lösung 3) 2 ml 1 mM wässrige Kaliumcyanid-Lösung + 98 ml Pyridin. Die Probe wurde gut gemischt und fünf Minuten bei 100 °C inkubiert. Ein positives Testergebnis wurde durch eine intensive Blaufärbung der Harzkügelchen angezeigt während bei einem negativen Test keine bzw. nur eine sehr geringe Verfärbung beobachtet wurde.

7.1.3 Analyse und Reinigung

Zur Reinigung der Peptide wurden 20-30 mg Rohpeptid in 1-3 ml Acetonitril/Wasser (1:4) gelöst und mittels präparativer HPLC getrennt. Die Fraktionen wurden mit Hilfe analytischer HPLC auf ihre Reinheit überprüft und die Identität der Peptide mittels Massenspektrometrie bestimmt. Fraktionen, die das gereinigte Peptid enthielten wurden vereinigt und das Acetonitril abgezogen. Die gereinigten Peptide wurden gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert.

7.1.4 Synthetisierte Peptide

Sofern nicht anders erwähnt wurde alle Peptide im 0,05 mmol-Maßstab mit Hilfe des SyroXP-1-Synthese-Roboters synthetisiert. Die Reinigung erfolgte mittels präparativer HPLC auf einer Phenomenex Luna C8 10 µm (250mm x 21.2 mm)-Säule und einem Gradienten von 5%-70% Laufmittel B in 30 min.

VPK-N-Abz Abz-KVSALKEKVASLKEKVSALKEEVASLEEKVSALK-OH

Molmasse	berechnet: 3787,1709 Da (monoisotopisch); 3789,3843 Da (gemittelt)
	bestimmt: 3787,1877 Da
Ausbeute	10 mg

VPK-C-Abz H₂N-KVSALKEKVASLKEKVSALKEEVASLEEKVSALK(Abz)K-NH₂

Die Synthese erfolgte am Rink-Amid-Harz, an welches als erste Aminosäure Fmoc-Lys(Mtt)-OH gekuppelt wurde. Nach Entfernung der Mtt-Schutzgruppe wurde Boc-Abz-OH an die ε-Aminogruppe des Lysins gekuppelt. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde abgespalten und nach dem manuellen Kuppeln des zweiten Lysin-Rests wurde die Synthese im Syntheseroboter fortgeführt.

Molmasse	berechnet: 3914,2818 Da (monoisotopisch) 3916,5738 Da (gemittelt)
	bestimmt: 3914,2484 Da
Ausbeute	5,2 mg

VPE-N-Y(NO₂) H₂N-Y(NO₂)-EVSALKEKVASLEKEVSALEKKVASLKKEVSALE-OH

Molmasse	berechnet: 3878,0774 Da (monoisotopisch) 3880,2782 Da (gemittelt)
	bestimmt: 3878,1156 Da
Ausbeute	5,3 mg

Bio-VPK	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEKVSALKEEVASLEEKVSALK-OH
Molmasse	berechnet: 4095,2863 Da (monoisotopisch) 4097,607 Da (gemittelt) bestimmt: 4095,3208 Da ($[M+4H]^{4+} = 1024,8302$)
Ausbeute	3,5 mg
Bio-VPK-TfeGly₁₆	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEK TfeGly SALKEEVASLEEKVSALK-OH
Molmasse	berechnet: 4135,2424 Da (monoisotopisch) 4137,499 Da (gemittelt) bestimmt: 4135,308 Da
Ausbeute	3 mg
Bio-VPK-DfpGly₁₆	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEK DfpGly SALKEEVASLEEKVSALK-OH
Molmasse	berechnet: 4131,2674 Da (monoisotopisch) 4133,5239 Da (gemittelt) bestimmt: 4131,35 Da ($[M+4H]^{4+} = 1033,8375$)
Ausbeute	7 mg
Bio-VPK-DfeGly₁₆	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEK DfeGly SALKEEVASLEEKVSALK-OH
Molmasse	berechnet: 4117,2518 Da (monoisotopisch) 4119,5084 Da (gemittelt) bestimmt: 4117,3372 Da ($[M+4H]^{4+} = 1030,3343$)
Ausbeute	4 mg
Bio-VPK-Asn₁₆	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEK NSALKEEVASLEEKVSALK-OH
Molmasse	berechnet: 4110,2609 Da (monoisotopisch) 4112,5783 Da (gemittelt) bestimmt: 4110,3196 Da ($[M+4H]^{4+} = 1028,5799$)
Ausbeute	1,8 mg
Bio-VPK-TfeGly₁₉	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEKVS ATfeGly KEEVASLEEKVSALK-OH
Molmasse	berechnet: 4121,2268 Da (monoisotopisch) 4123,4720 Da (gemittelt) bestimmt: 4121,3128 Da ($[M+4H]^{4+} = 1031,3282$)
Ausbeute	4,7 mg
Bio-VPK-DfpGly₁₉	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEKVS ADfpGly KEEVASLEEKVSALK-OH
Molmasse	berechnet: 4117,2518 Da (monoisotopisch) 4119,4970 Da (gemittelt) bestimmt: 4117,3244 Da ($[M+4H]^{4+} = 1030,3311$)
Ausbeute	3,5 mg

Bio-VPK-DfeGly₁₉	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEKVSADfeGlyKEEVASLEEKVSALK-OH
Molmasse	berechnet: 4103,2362 Da (monoisotopisch) 4105,4814 Da (gemittelt) bestimmt: 4103,3204 Da ([M+4H] ⁴⁺ = 1026,8301)
Ausbeute	4 mg
Bio-VPK-Glu₁₉	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEKVSAAKEEVASLEEKVSALK-OH
Molmasse	berechnet: 4111,2449 Da (monoisotopisch) 4113,5630 Da (gemittelt) bestimmt: 4111,2876 Da ([M+4H] ⁴⁺ = 1028,8219)
Ausbeute	6,3 mg
Bio-VPK-Ala₁₉	Biotin-GSGKVSALKEKVASLKEKVSAAKEEVASLEEKVSALK-OH
Molmasse	berechnet: 4053,2394 Da (monoisotopisch) 4055,5263 Da (gemittelt) bestimmt: 4053,3404 Da ([M+4H] ⁴⁺ = 1014,3351)
Ausbeute	3,9 mg
VPE-Y₁₅I₁₆	Abz-EVSALEKEVASLEKYISALEKKVASLKKEVSALE-OH
Molmasse	berechnet: 3837,1025 Da (monoisotopisch) 3839,3543 Da (gemittelt) bestimmt: 3837,2296 Da ([M+4H] ⁴⁺ = 960,3074)
Ausbeute	5 mg
VPE-L₁₅I₁₆	Abz-EVSALEKEVASLEKLISALEKKVASLKKEVSALE-OH
Molmasse	berechnet: 3787,1233 Da (monoisotopisch.) 3789,3378 Da (gemittelt) bestimmt: 3787,2348 Da ([M+4H] ⁴⁺ = 947,8087)
Ausbeute	4 mg
VPE-L₁₅I₁₆Y₁₉	Abz-EVSALEKEVASLEKLISAYEKKVASLKKEVSALE-OH
Molmasse	berechnet: 3837,1025 Da (monoisotopisch) 3839,3543 Da (gemittelt) bestimmt: 3837,2228 Da ([M+4H] ⁴⁺ = 960,3057)
Ausbeute	4,2 mg
VPK-E₁₉	Abz-KVSALKEKVASLKEKVSAAKEEVASLEEKVSALK-OH
Molmasse	berechnet: 3803,1294 Da (monoisotopisch) 3805,3403 Da (gemittelt) bestimmt: 3803,1544 Da ([M+4H] ⁴⁺ = 951,7886)
Ausbeute	8,8 mg

VPE-L₁₆L₂₀K₂₃	Abz-EVSALEKEVASLEKELSALLKKKASLKKEVSALE-OH
Molmasse	berechnet: 3816,1498 Da (monoisotopisch) 3818,1498 Da (gemittelt) bestimmt: 3816,1895 Da
Ausbeute	7,2 mg
VPK-N₁₆	Abz-KVSALKEKVASLKEKNSALKEEVASLEEKVSALK-OH
Molmasse	berechnet: 3802,1454 Da (monoisotopisch) 3804,3557 Da (gemittelt) bestimmt: 3802,1955 Da
Ausbeute	12 mg
VPE-L₁₆	Abz-EVSALEKEVASLEKELSALEKKVASLKKEVSALE-OH
Molmasse	berechnet: 3803,0818 Da (monoisotopisch) 3805,2938 Da (gemittelt) bestimmt: 3803,122 Da
Ausbeute	8 mg
VPE	Abz-EVSALEKEVASLEKEVSALEKKVASLKKEVSALE-OH
Molmasse	berechnet: 3789,0661 Da (monoisotopisch) 3791,2669 Da (gemittelt) bestimmt: 3789,1074 Da
Ausbeute	5 mg
VPE-L₂₀	Abz-EVSALEKEVASLEKEVSALLKKVASLKKEVSALE-OH
Molmasse	berechnet: 3773,1076 Da (monoisotopisch) 3775,3109 Da (gemittelt) bestimmt: 3773,1492 Da
Ausbeute	2 mg
VPE-Y₁₆L₂₀L₂₃	Abz-EVSALEKEVASLEKEYSALLKKLASLKKEVSALE-OH
Molmasse	berechnet: 3851,1182 Da (monoisotopisch) 3853,3812 Da (gemittelt) bestimmt: 3851,166 Da
Ausbeute	4,4 mg
VPE-L₁₆L₂₀	Abz-EVSALEKEVASLEKELSALLKKVASLKKEVSALE-OH
Molmasse	berechnet: 3787,1233 Da (monoisotopisch) 3789,3378 Da (gemittelt) bestimmt: 3787,1084 Da
Ausbeute	2,5 mg

VPE-L₁₆L₂₀Y₂₃	Abz-EVSALEKEVASLEKELSALLKKYASLKKEVSALE-OH
Molmasse	berechnet: 3851,1182 Da (monoisotopisch) 3853,3812 Da (gemittelt) bestimmt: 3851,1696 Da
Ausbeute	5,5 mg
VPE-N₁₆	Abz-EVSALEKEVASLEKENSALKKVASLKKEVSALE-OH
Molmasse	berechnet: 3804,0407 Da (monoisotopisch) 3806,2382 Da (gemittelt) bestimmt: 3804,074 Da ([M+4H] ⁴⁺ = 952,0185)
Ausbeute	3 mg
VPE-L₁₆L₂₀L₂₃	Abz-EVSALEKEVASLEKELSALLKKLASLKKEVSALE-OH
Molmasse	berechnet: 3801,1389 Da (monoisotopisch) 3803,3648 Da (gemittelt) bestimmt: 3801,118 Da
Ausbeute	10,2 mg

Die folgenden Peptide wurden von Herrn Dipl.-Chem. Mario Salwiczek in der Arbeitsgruppe von Prof. Kocsch synthetisiert und freundlicherweise für die CD-spektroskopischen Untersuchungen zur Verfügung gestellt:

VPK-DfeGly16	Abz-KVSALKEKVASLKEK DfeGly SALKEEVASLEEKVSALK-OH
VPK-DfpGly16	Abz-KVSALKEKVASLKEK DfpGly SALKEEVASLEEKVSALK-OH
VPK-TfeGly16	Abz-KVSALKEKVASLKEK TfeGly SALKEEVASLEEKVSALK-OH
VPK-DfeGly19	Abz-KVSALKEKVASLKEKVS DfeGly KEEVASLEEKVSALK-OH
VPK-DfpGly19	Abz-KVSALKEKVASLKEKVS DfpGly KEEVASLEEKVSALK-OH
VPK-TfeGly19	Abz-KVSALKEKVASLKEKVS TfeGly KEEVASLEEKVSALK-OH

7.2 Faltungsstudien

7.2.1 Allgemeine Bedingungen

Sämtliche Strukturuntersuchungen wurden in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 durchgeführt. Peptidstammlösungen (80 – 500 μM) wurden ebenfalls in 100 mM Phosphatpuffer angesetzt und der pH nach dem Lösen des Peptids mit Na_2HPO_4 (500 μM) eingestellt. Nach der Bestimmung der Peptidkonzentration wurden die Stammlösungen bis zu ihrer Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Herstellung und Lagerung der Stammlösungen sowie der jeweils zu messenden Ansätze erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen.

7.2.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Abz-markierten Peptide erfolgte mittels UV-Spektroskopie bei $\lambda_{\text{Abs}} = 320\text{ nm}$ unter Verwendung eines Varian Cary 50 Photometers (*Varian Medical Systems*).

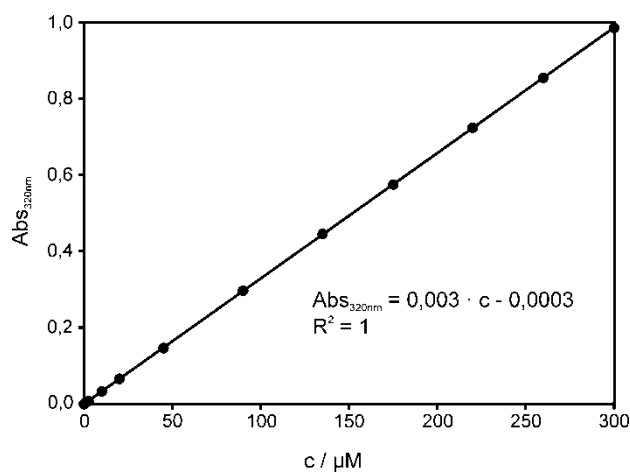


Abbildung 7.1. Kalibriergerade zur photometrischen Bestimmung der Peptidkonzentration.

Hierfür wurden 30-50 μl der zu untersuchenden Peptidstammlösung (3-5 mg/ml) zusammen mit 857 μl 7M GndHCl in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 auf ein Endvolumen von 1 ml verdünnt (6 M GndHCl, 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4). Die Messung der UV-Absorption erfolgte in 1,5 ml PMMA Küvetten (Plastibrand®, VWR). Aus den ermittelten Werten für die Absorption wurde die Konzentration über eine Kalibriergerade bestimmt, welche mit unterschiedlichen Konzentrationen Abz-Gly-OH·HCl unter denselben Bedingungen aufgenommen wurde (Abbildung 7.1).

7.2.3 CD-Spektroskopie

CD-Spektren wurden an einem Jasco J-715 Spektrometer, ausgestattet mit einem PTC-348WI Pelletier Temperaturregler (*Jasco*) bei einem konstanten N₂-Strom von 3,0 – 3,3 l/min aufgenommen. Die Steuerung und Datenanalyse erfolgte mit der Software J-700 für Windows.

Alle Messungen erfolgten bei Peptidkonzentrationen zw. 20 µM und 50 µM in 1mm SUPRASIL®-Quarzküvetten (Probenvolumen 200 µl) unter folgenden Bedingungen:

Startwellenlänge:	240 nm	Endwellenlänge:	190 nm
Scan-Modus:	<i>continuous</i>	Auflösung:	0,2 nm
Geschwindigkeit:	50 nm/min	Empfindlichkeit:	50 mdeg
Bandbreite:	2 nm	<i>Response</i> :	1 s
Temperatur:	20 °C	Wiederholungen:	3

Das Spektrum des jeweiligen Puffers diente als Leerwert und wurde von den gemessenen Spektren abgezogen. Die gemessenen CD-Werte wurden mit Hilfe der Software Microcal Origin (Version 7.0, *Origin Lab Corporation*) und folgender Formel in molare Elliptizität $[\Theta]$ umgerechnet:

$$[\Theta] = \frac{\Theta_{\text{obs}}}{10000 \times l \times c \times n}$$

Θ_{obs} = gemessene Elliptizität in Grad

c = Peptidkonzentration in mol/l

l = Schichtdicke in cm

n = Anzahl an Aminosäuren

Die Thermische Denaturierung wurde an demselben Gerät unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Wellenlänge	222 nm	Endtemperatur:	95 °C
Starttemperatur:	20 °C	<i>Wait-Time</i> :	0 s
Auflösung:	0,1 °C	<i>Response</i> :	2 s
Geschwindigkeit:	3°C/min	Empfindlichkeit:	100 mdeg
Bandbreite:	2 nm		

Für die Bestimmung der Schmelzpunkte wurden die erhaltenen Daten nach folgender Formel gefittet:

$$f_n(T) = \frac{\Theta_{\text{obs}} - (m_f \times T + \Theta_f)}{(m_{\text{unf}} \times T + \Theta_{\text{unf}}) - (m_f \times T + \Theta_f)}$$

m_f = Anstieg der gefalteten Zustands

Θ_f = CD-Signal des gefalteten Zustands

m_{unf} = Anstieg des ungefalteten Zustands

Θ_{unf} = CD-Signal des ungefalteten Zustands

T = Temperatur in K

Der Wendepunkt der erhaltenden Funktion entspricht dem jeweiligen Schmelzpunkt.¹⁹⁴

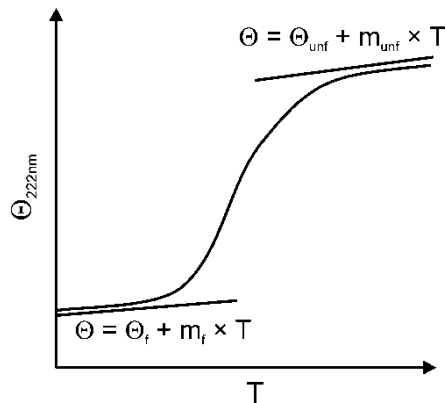


Abbildung 7.2. Schematische Darstellung der Schmelzkurve eines Peptids mit den jeweils für den vollständig gefalteten und entfalteten Bereich interpolierten Geraden.

7.2.4 Fluoreszenzspektroskopie

Da aufgrund der verwendeten Fluoreszenzmarker keine einheitliche Konzentrationsbestimmung der Proben vorgenommen werden konnte, wurde sich ausschließlich auf die Peptideinwaage bezogen und die Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ angegeben. Die einzelnen Proben wurden ausgehend von Peptid-Stammlösungen einer Konzentration von 4 mg/ml hergestellt. Das Probenvolumen betrug jeweils 500 μl . Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte an einem Lumineszenz Spektrometer LS 50B (Fa Perkin Elmer) unter Verwendung einer 1 cm Quarz Suprasil[®] Küvette (Fa Hellma) bei 25 °C und den unten angegebenen Geräteeinstellungen.

Anregungswellenlängen: 222 nm

Startwellenlänge: 350 nm

Spaltweite_{Anregung}: 12,5

Scan-Geschwindigkeit: 300 nm/min

Akkumulationen: 3

Endwellenlänge: 550 nm

Spaltweite_{Emission}: 9,0

7.2.5 Analytische Ultrazentrifugation

Die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Helmut Cölfen am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung an einer XL-I Ultrazentrifuge (*Beckman-Coulter*, Palo Alto, CA). Die Sedimentationsgeschwindigkeit wurde bei 60000 rpm und einer Gesamtpeptidkonzentration von 50 μM ; das Sedimentationsgleichgewicht bei 35000 rpm und Peptidkonzentrationen zwischen 20 μM und 100 μM bestimmt. Alle Versuche erfolgten bei 25 °C in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 ($\rho = 1,009725 \text{ g/ml}$; $\eta = 1,01272$). Das partielle spezifische Volumen der einzelnen Peptide wurde unter Verwendung der Software SEDNTERP^{195,196} berechnet. Als partielles spezifisches Volumen der Heteromere diente das arithmetische Mittel der Werte der jeweiligen Komponenten. Die Auswertung der Geschwindigkeitsexperimente erfolgte unter Verwendung des Programms SEDFIT¹⁹⁷. Die Bestimmung der molaren Masse anhand des Sedimentationsgleichgewichts erfolgte mit Hilfe der Programme WINNONLIN (*Beckman Coulter*) und MSTAR.¹⁸²

Die Peptidstammlösungen für die Ultrazentrifugationsexperimente wurden dreimal für jeweils 8-12 h gegen ca. 500 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4 unter Verwendung einer SpectraPor®-Membran (MWCO; *Carl Roth GmbH*) dialysiert.

Tabelle 7.2. Berechnete partielle spezifische Volumina der untersuchten VPK- und VPE-Varianten.

Peptid	partielles spezifisches Volumen (ml/g)
VPK	0,7713
VPK-E ₁₉	0,7634
VPE-L ₂₀	0,7680
VPE-L ₁₆ L ₂₀	0,7695
VPE-Y ₁₆ L ₂₀ L ₂₃	0,7645
VPE-L ₁₆ L ₂₀ Y ₂₃	0,7645

7.3 Molekularbiologie und Phage-Display

Chemikalien und Reagenzien:

Agar-Agar (*Carl Roth GmbH + Co. KG*, Art.-Nr. 4508.1) Agarose (*Carl Roth GmbH + Co. KG*, Art.-Nr. 2267.3), Bromphenolblau (*Merck KGaA*, Art.-Nr. 1081220005), Carbenicillin (*SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH*, Art.-Nr. C1389-5G), dNTP-Mix 10 mM (*New England Biolabs GmbH*, Art.-Nr. N0447 S), Ethanol 96% (*Carl Roth GmbH + Co. KG*, Art.-Nr. P075.1), Guanidinhydrochlorid BioChemika $\geq 99.0\%$ (*SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH*, Art.-Nr. 50940-500G), D(+)-Glucose, wasserfrei p.a., ACS (*Carl Roth GmbH + Co. KG*, Art.-Nr. 997.2), Glycerin BioChemika Ultra, wasserfrei, $\geq 99.5\%$ (*SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH*, Art.-Nr. 49767-250ML), Hefeextrakt, BioChemika (*AppliChem GmbH*, Art.-Nr. A1552,1000), Kaliumchlorid $\geq 99.5\%$, p.a., ACS (*Carl Roth GmbH + Co. KG*, Art.-Nr. 6781.1), Kaliumdihydrogenphosphat $\geq 99.0\%$, p.a., ACS (*Carl Roth GmbH + Co. KG*, Art.-Nr. 3904.1), Kanamycinsulfat (*Carl Roth GmbH + Co. KG*, Art.-Nr. T832.2), Magnesiumchlorid-Hexahydrat $\geq 99.0\%$, p.a., ACS (*Carl Roth GmbH + Co. KG*, Art.-Nr. 2189.1), Milchpulver, Blotting grade (*Carl Roth GmbH + Co. KG*, Art.-Nr. T145.2), MOPS PUFFERAN® (*Carl Roth GmbH + Co. KG*, Art.-Nr. 6979.4), Natriumacetat $\geq 99.0\%$, p.a., ACS, wasserfrei (*Carl Roth GmbH + Co. KG*, Art.-Nr. 6773.2), Natriumazid BioChemika Ultra, $\geq 99.5\%$ (*SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH*, Art.-Nr. 71289-5G), Natriumchlorid $\geq 99.5\%$, p.a., ACS (*Carl Roth GmbH + Co. KG*, Art.-Nr. 3957.1), Orange G (*SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH*, Art.-Nr. O3756-25G), Polyethylenglykol (PEG) 8000 (*SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH*, Art.-Nr. 81268-1KG), Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (*Carl Roth GmbH + Co. KG*, Art.-Nr. 8986.2), Rotilabo®-Spritzenfilter, CME \varnothing 0,22 μm , steril (*Carl Roth GmbH + Co. KG*, Art.-Nr. KH54.1), Tris-Hydrochlorid Pufferqualität (*AppliChem GmbH*, Art.-Nr. A1086,1000), Tween 20, for molecular biology (*SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH*, Art.-Nr. P9416-100ML), Xylencyanol (*SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH*, Art.-Nr. X4126-10G).

Enzyme:

Sfi I, rekombinant (*New England Biolabs GmbH*, Art.-Nr. R0123S), T4 DNA Ligase (*New England Biolabs GmbH*, Art.-Nr. M0202S), Taq DNA-Polymerase (*New England Biolabs GmbH*, Art.-Nr. M0273 S), Trypsin aus Rinderpankreas, TPCK-behandelt, ≥ 10000 BAEE (*SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH*, Art.-Nr. T-1426-1G)

Bakterien, Helferphagen, Plasmide:

E. coli K12 ER2738 (New England Biolabs, Art.-Nr. E4104S), pComb3H phagemid Vektor (GenBank database accession number: AF268280, Barbas Laboratory, TSRI), VCSM13 Helferphagen (*Stratagene*, Art.-Nr. 200251).

7.3.1 Puffer und Medien

Agar Platten: Luria Broth (LB)-Agar wurde in einer Mikrowelle geschmolzen und auf PS-Petrischalen verteilt (jeweils ca. 30 ml/Schale). Für die Herstellung von Carbenicillin Agar-Platten wurde der geschmolzene LB-Agar auf ca. 50 °C abgekühlt. Anschließend wurde Carbenicillin-Stammlösung bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben und der Agar auf Petrischalen verteilt. Nach dem Abkühlen wurden die Agar-Platten bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

Annealing-Puffer, 10×: 1,21 g Tris-HCl (100 mM), 407 mg MgCl₂ (20 mM) und 2,92 g NaCl (500 mM) wurden in destilliertem Wasser gelöst, auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt und pH = 7,5 eingestellt. Der Puffer wurde autoklaviert und bei RT gelagert.

Carbenicillin-Stammlösung: Carbenicillin wurde in destilliertem Wasser gelöst (100 mg/ml), steril filtriert (0,22 µm) und in 1 ml Aliquote aufgeteilt. Die Lagerung der Aliquote erfolgte bei -20 °C.

DNA Gel-Beladungspuffer, 5×: 3,45 ml Glycerin (30%), 186,2 mg EDTA (50 mM) und 10 mg Farbstoff (0,1 %) wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf ein Endvolumen von 10 ml aufgefüllt. Folgende Farbstoffe wurden als Marker für die DNA-Gelelektrophorese verwendet: Orange G (200 bp), Bromphenolblau (500 bp), Xylencyanol (2 kbp). Die drei Farbstofflösungen wurden mit einander vermischt und für die Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese verwendet.

Kanamycin-Stammlösung: Kanamycin wurde in destilliertem Wasser gelöst (50 mg/ml), steril filtriert (0,22 µm) und in 1 ml Aliquote aufgeteilt welche bei -20 °C gelagert wurden.

Luria Broth (LB) Agar: 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl wurden in destilliertem Wasser gelöst, auf ein Endvolumen von 1 l aufgefüllt und mit NaOH pH = 7,0 eingestellt. Jeweils 4,8 g Agar-Agar wurden in 300 ml des hergestellten Mediums gelöst (in 500 ml Gewindeflaschen), autoklaviert und bei RT gelagert.

Luria Broth (LB) Medium: 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl wurden in destilliertem Wasser gelöst, auf ein Endvolumen von 1 l aufgefüllt und mit NaOH pH = 7,0 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium bei 4 °C gelagert.

Luria Broth (LB) Top-Agar: 625 mg Pepton, 312,5 mg Hefeextrakt, 312,5 mg NaCl und 358 mg Agar-Agar wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf ein Endvolumen von 50 ml aufgefüllt. Der Top-Agar wurde autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

3 M Natriumacetat, pH 5,2: 16,33 g Natriumacetat wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf ein Endvolumen von 40 ml aufgefüllt. Nach dem Einstellen des pH mit Essigsäure wurde die Lösung autoklaviert und bei RT gelagert.

PBS-Puffer: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,7 g Na₂HPO₄ und 163 mg KH₂PO₄ wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf ein Endvolumen von 1 l aufgefüllt. Nach dem Einstellen des pH-Werts auf 7,4 wurde der Puffer autoklaviert und bei RT gelagert.

PBS-T: PBS-Puffer + 0,1 % (v/v) Tween 20.

PEG/NaCl-Lösung: 100 g Polyethylenglycol-8000 (20%) und 73 g NaCl (2,5 M) wurden in destilliertem Wasser gelöst, auf ein Endvolumen von 500 ml aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

SOC-Medium: 4 g Pepton, 1 g Hefeextrakt und 100 mg NaCl wurden in 150 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach der Zugabe von 2 ml 0,25 M KCl-Lösung sowie 2 ml 1 M MgCl-Lösung wurde mit NaOH pH = 7,0 eingestellt und das Medium mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1 l aufgefüllt. Anschließend wurde das Medium auf 50 ml Portionen aufgeteilt und autoklaviert. Nach der Zugabe von jeweils 200 µl 1 M Glukose-Lösung (steril filtriert) wurde das Medium bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

SB-Medium: 10 g MOPS, 20 g Hefeextrakt und 30 g Pepton wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf ein Endvolumen von 1 l aufgefüllt. Nach dem Einstellen von pH = 7,0 wurde das Medium autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

TAE-Puffer, 100x: 484 g Tris-HCl wurden in 200 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach der Zugabe von 114,2 ml Eisessig sowie 200 ml 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0 wurde der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt, steril filtriert (0,22 µm) und bei RT gelagert.

TBS-Puffer: 8,7 g NaCl und 6,1 g Tris-HCl wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf ein Endvolumen von 1 l aufgefüllt. Nach dem Einstellen von pH = 7,4 wurde der Puffer autoklaviert und bei RT gelagert.

TBS-T: TBS-Puffer + 0,1 % (v/v) Tween 20.

7.3.2 DNA-Präparation und DNA-Reinigung

Die Isolierung und Reinigung von DNA erfolgte mittels Gelelektrophorese und anschließender Extraktion der DNA aus den entsprechenden Gelabschnitten unter Verwendung eines *QIAquick® Gel Extraction Kit* nach der vom Hersteller angegebenen Vorschrift.

7.3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die zu trennende DNA-Lösung wurde vor der Auftragung auf das Agarose-Gel mit 0,25 Volumenanteilen 5×DNA-Gel-Beladungspuffer vermischt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80-120 V durchgeführt. Soweit nicht anders aufgeführt, erfolgte die Auftrennung von PCR-Ansätzen unter Verwendung von 2 %igen Agarosegelen und die Reinigung des Sfi I-verdauten Plasmids auf 0,7 %igen Agarosegelen welche jeweils 20 ng/ml Ethidiumbromid enthielten.

7.3.2.2 DNA-Fällung

Die DNA-Lösung wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat pH 5,2 vermischt und die DNA nach Zugabe von 3 Volumenanteilen eisgekühltem Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Die gefällte DNA wurde 15 min bei 13000 rpm/ 4 °C zentrifugiert, das DNA-Pellet 5 min an der Luft getrocknet und in Wasser bzw. Puffer gelöst.

Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch bestimmt und nach folgender Formel aus der ermittelten optischen Dichte berechnet:

$$c(\text{ng}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{DF} \times \text{SF} \times d^{-1}$$

OD = optische Dichte; DF = Verdünnungsfaktor; SF = spezifischer Faktor (50 für doppelsträngige DNA, 33 für einzelsträngige DNA, 20 für Oligonukleotide); d = Schichtdicke in cm.

7.3.2.3 Plasmidpräparation

Maxipräparation: 50 µl frisch aufgetaute elektrokompetente ER2738-Zellen wurden mit 1 µl Plasmid pComb3H (10 pg/µl) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (10 min auf Eis gekühlt) gemischt, in eine Elektroküvette (ebenfalls 10 min vorgekühlt) überführt und 1 min auf Eis gekühlt. Nach Elektroporation bei 2,5 kV wurden die Zellen in 900 µl vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und 20 min bei 37 °C/200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 10 µl und 100 µl der Kultur auf Carbenicillin-Agarplatten (100 µg/ml) ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

In 5 ml vorgewärmtem SB-Medium + 500 µg/ml Carbenicillin wurde eine Einzelkolonie von einer der Carbenicillin-Platten suspendiert und bei 37 °C/200 rpm inkubiert. Nach 8 h wurde die Kultur zusammen mit 95 ml vorgewärmtem SB-Medium in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt und nach Zugabe von 500 µg/ml Carbenicillin bei 37 °C/200 rpm für weitere 16 h inkubiert. Die Plasmid DNA wurde unter Verwendung eines *QIAGEN® Plasmid Maxi Kit* nach der vom Hersteller angegebenen Vorschrift isoliert und gereinigt. Die isolierte Plasmid DNA wurde in 150 µl TE-Puffer pH 7,4 gelöst, wobei DNA-Konzentrationen von 3500 - 4000 ng/µl erreicht wurden. Die Plasmid DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Minipräparation: Die gewünschte *E.coli*-Einzelkolonie wurde in 3 ml vorgewärmtem SB-Medium + 67 µg/ml Carbenicillin suspendiert und 16 h bei 37°C/200rpm kultiviert. Die Kultur wurde auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und aus dem Pellet unter Verwendung eines *QIAprep Spin Miniprep Kit* nach der vom Hersteller angegebenen Vorschrift die Plasmid-DNA isoliert. Die DNA wurde in 30 µl 10 mM Tris-Puffer pH 8,5 aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

7.3.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Alle verwendeten Materialien und Flüssigkeiten wurden vor ihrer Verwendung autoklaviert. Die Resuspension der Zellpellets erfolgte mit Hilfe einer 5 ml Pipette und Pipettenspitzen deren Spitzen zur Verminderung von Scherkräften abgeschnitten wurden.

7.3.3.1 Protokoll 1: Herstellung von 55 µl Aliquoten

100 ml vorgewärmtes LB-Medium wurden mit einer frischen ER2738-Einzelkolonie angeimpft und 16 h bei 37°C/200 rpm kultiviert. Zweimal je 500 ml vorgewärmtes SB-Medium (in 2 l-Erlenmeyerkolben) wurden jeweils mit 500 µl dieser Vorkultur angeimpft und bei 37°C/200 rpm bis zu einer $OD_{595nm} = 0,5$ kultiviert. Die Zellkultur wurde auf vier Zentrifugenbecher verteilt und 10 min bei 3000 g/4 °C zentrifugiert (Rotor GSA). Die Pellets wurden jeweils in 5 ml eisgekühltem Wasser suspendiert, in zwei Zentrifugenbechern vereinigt und diese jeweils bis ca. 75% der Füllhöhe mit eisgekühltem Wasser aufgefüllt. Nach 10 min Zentrifugation bei 3000 g/4 °C wurden die Zellen in 5 ml 10% Glycerin/Wasser suspendiert, in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 10% Glycerin auf 20 ml aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min bei 3000 g/4 °C) wurden beide Zellpellets in jeweils 5 ml 10% Glycerin suspendiert, in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt und dieses mit 10% Glycerin auf 30 ml aufgefüllt. Nach 10 min Zentrifugation bei 3000 g/4 °C wurden die Zellen in 1 ml 10% Glycerin suspendiert und mit 10 % Glycerin bis zu einer $OD_{595nm} = 1,0$ (gemessen bei einer Verdünnung 1:100) verdünnt. Die Zellen wurden in 55 µl Portionen auf 0,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquote wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

7.3.3.2 Protokoll 2: Herstellung von 300 µl Aliquoten

Jeweils 2,5 ml Übernachtskultur wurden in vier Erlenmeyerkolben mit jeweils 500 ml vorgewärmtem SB-Medium, 10 ml 20% Glucose (w/v) und 5 ml 1 M $MgCl_2$ suspendiert und bei 37 °C/200 rpm inkubiert. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{595nm} = 0,8$ (ca. 3 h) wurden die Zellkulturen in vier gekühlte 500 ml-Zentrifugenbecher überführt und 15 min auf Eis gekühlt. Die gekühlten Zellkulturen wurden 20 min bei 3000 g/4 °C zentrifugiert (Rotor GSA). Die Zellpellets wurden anschließend in 10 ml 10% Glycerin (gekühlt) suspendiert, auf zwei 500 ml-Zentrifugenbecher verteilt und diese mit 10% Glycerin aufgefüllt. Nach 20 min Zentrifugation bei 3000 g/4 °C wurden die Zellen erneut in 10 ml 10% Glycerin suspendiert, die Zentrifugenbecher mit 10% Glycerin aufgefüllt und 20 min bei 3000 g/4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellpellets in jeweils 25 ml 10% Glycerin suspendiert, in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und diese mit 10% Glycerin aufgefüllt. Die Suspension wurde 15 min bei 2500 g/4 °C zentrifugiert (Rotor GSA + Einsätze) und der Überstand im Anschluss vorsichtig dekantiert. In der verbliebenen Flüssigkeit wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert, in einem Zentrifugenröhrchen

vereinigt und in 300 µl Portionen auf 0,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Aliquote wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

7.3.3.3 Kompetenztest

50 µl frisch aufgetaute elektrokompetente ER2738-Zellen wurden mit 1 µl Plasmid pComb3H (10 pg/µl) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (10 min auf Eis gekühlt) gemischt, in eine Elektroküvette (ebenfalls 10 min vorgekühlt) überführt und 1 min auf Eis gekühlt. Nach Elektroporation bei 2,5 kV wurden die Zellen in 3 ml vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und die Zellsuspension wurde in einem 12 ml Zentrifugenröhrchen 1 h bei 37 °C/200 rpm inkubiert. Nach dem Verdünnen mit 7 ml SB-Medium wurden 5 µl (bzw. 50 µl einer 1:10 Verdünnung) und 50 µl der Zellkultur auf Carbenicillin-Agarplatten (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach dem Auszählen der Bakterienkolonien wurde die Kompetenz der Zellen nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Kompetenz} = \frac{\text{Anzahl Kolonien}}{\text{Ausstreichvolumen } (\mu\text{l})} \times \frac{1 \times 10^4 \mu\text{l}}{10 \text{ pg}} \times \frac{1 \times 10^6 \text{ pg}}{1 \mu\text{g}}$$

Für die hergestellten elektrokompetenten Zellen wurden Werte zwischen 1×10^8 und 2×10^9 Kolonien/µg Plasmid erreicht, wobei für die Herstellung der Phagen-Bibliotheken nur Zellen mit einer Kompetenz von mindestens 1×10^9 Kolonien/µg Plasmid verwendet wurden.

7.3.4 PCR-Kolonie-Scan und DNA-Sequenzierung

Folgende DNA-Primer wurden von der Firma *biomers.net GmbH* (Ulm, Deutschland) bezogen und für die PCR-Kolonie-Scans sowie die Sequenzierung der an das 5'-Ende des pIII-Gens im pComb3H-Plasmid fusionierten DNA-Fragmente verwendet:

ompseq (vorwärts-Primer): 5'-AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA G-3'

gback (rückwärts-Primer): 5'-GCC CCC TTA TTA GCG TTT GCC ATC-3'

Zur Überprüfung der Klonierung sowie zur Identifizierung der im Phage Display selektierten M13-Phagen wurden Test-PCRs durchgeführt. Dazu wurde jeweils ein Teil der zu untersuchenden Bakterienkolonie mit der PCR-Lösung vermischt, wobei ein Ansatz ohne Bakterien bzw. DNA als Negativkontrolle diente.

PCR Probe:

5 µl 10x PCR-Puffer
 5 µl 2.5 mM dNTP Mix
 0,5 µl ompseq (250 ng/µl)
 0,5 µl gback (250 ng/µl)
 0,25 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
 38,75 µl H₂O

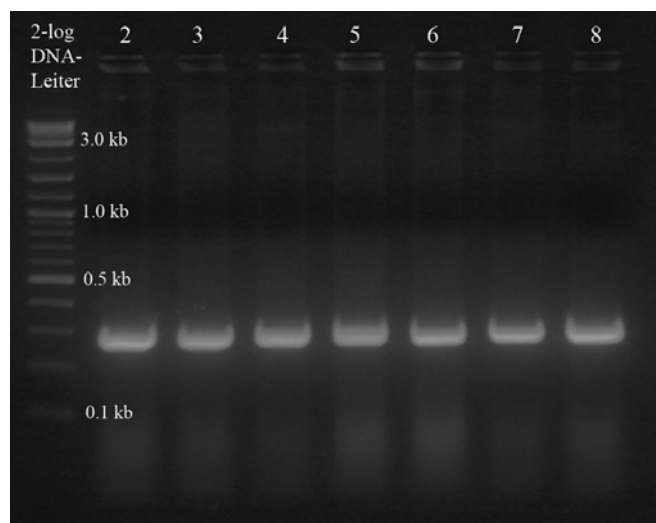
PCR Programm:

94°C - 2 min
 94°C - 0.5 min]
 55°C - 0.5 min } 25 Zyklen
 72°C - 0.5 min]
 72°C - 10 min
 4°C

Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert

Abbildung 7.3. Agarose-Gel eines PCR-Kolonie-Scans. Bande 1: 2-log DNA-Leiter. Banden 2-8: PCR-Proben.

Die unter 2-8 zu erkennenden Banden bei ca. 300 bp entsprechen dem Insert des verwendeten pIII-Fusionspeptids.



Da durch die Test-PCR zwar die Größe, jedoch nicht die Sequenz der DNA-Inserts bestimmt werden kann, wurde diese mittels DNA-Sequenzierung ermittelt. Dazu wurden die entsprechenden Banden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und die DNA extrahiert. Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma *Sequence Laboratories Göttingen GmbH* unter Verwendung der Primer *ompseq* bzw. *gback* durchgeführt (Probe: 100 ng DNA + 175 ng Primer in 7 µl 10 mM Tris-HCl Puffer pH 8,5).

7.3.5 Herstellung der Helferphagen

Phageninfektion: 2 μ l elektrokompente ER2738-Zellen wurden in 2 ml vorgewärmtem SB-Medium suspendiert und 1h bei 37°C/200 rpm inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 μ l dieser Bakterienkultur mit 1 μ l einer 10^{-5} bzw. einer 10^{-6} verdünnten Suspension einer VCSM13 Stammlösung (*Stratagene*) infiziert. Nach 15 min bei RT wurden die infizierten *E.coli*-Kulturen mit 3 ml flüssigem Top-Agar vermischt, auf Agarplatten ausgegossen und ü.N. bei 37 °C inkubiert

Phagenamplifizierung: Infizierte *E.coli*-Zellen aus einem isolierten Plaque wurden in 2 ml vorgewärmtem SB-Medium suspendiert. Nach 1h bei 37°C/200 rpm wurden die *E.coli*-Kultur in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml vorgewärmtem SB-Medium + 140 μ l Kanamycin (50 mg/ml) überführt und bei 37°C/200 rpm ü.N. kultiviert.

Phagenpräparation: Die Übernachtskultur wurde auf zwei 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und die Bakterien 15 min bei 2500 g/4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in zwei frische 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 20 min bei 70 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 2500 g/4°C zentrifugiert, die Überstände in frische Zentrifugenröhrchen überführt und die erhaltene Phagensuspension bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

Titerbestimmung der Helferphagen: 10 μ l elektrokompente ER2738-Zellen wurden in 10 ml vorgewärmtem SB-Medium suspendiert und bei 37°C/200 rpm inkubiert bis eine $OD_{600nm}=1,0$ erreicht wurde (ca. 2,5 h). Jeweils 200 μ l der *E.coli*-Kultur wurden mit 1 μ l einer 10^{-4} , 10^{-5} und einer 10^{-6} Verdünnung der Helferphagen-Stammlösung infiziert. Nach 15 min bei RT/350 rpm wurden die infizierten *E.coli*-Kulturen mit 3 ml flüssigem Top-Agar (50°C, Wasserbad) vermischt, auf Agarplatten ausgegossen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plaques auf den verschiedenen Platten gezählt und die Konzentration der Helferphagen auf Werte zw. $5,5 \times 10^9$ bis $1,5 \times 10^{10}$ pfu/ml berechnet.

7.3.6 Molekulare Klonierung und Herstellung der Phagenbibliothek

Die das VPE-Peptid bzw. die VPE-Bibliotheken codierende DNA wurde an das 5'-Ende von Gen III in den Vektor pComb3H ligiert. Dazu wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym Sfi I verdaut und die DNA an der Schnittstelle in den Vektor eingefügt.

Das neu kombinierte Plasmid wurde anschließend in *E.coli* transfiziert und über die auf dem Vektor codierte Carbenicillin-Resistenz isoliert.

Folgende, 5'-phosphorylierten DNA-Fragmente wurden von der Firma *biomers.net GmbH* (Ulm) bezogen und ohne weitere Modifizierung für die Klonierung verwendet:

Die Schreibweise der Basentriplets entspricht dem Leseraster. Die den Sfi I-Schnittstellen komplementären Enden sind grau hinterlegt.

VPE - sense-Strang

5'Phosphat-**CGGCC** GAG GTT AGC GCG CTG GAA AAG GAG GTG GCC AGT TTA GAG AAA
GAG GTT AGT GCC CTG GAA AAG AAA GTA GCG AGC CTG AAA AAG GAG GTA AGT GCG
TTA GAA **GGCCAGGC**-3'

VPE - antisense-Strang

5'Phosphat-**TGGCC** TTC TAA CGC ACT TAC CTC CTT TTT CAG GCT CGC TAC TTT CTT TTC CAG
GGC ACT AAC CTC TTT CTC TAA ACT GGC CAC CTC CTT TTC CAG CGC GCT AAC CTC
GGCCGCCT-3'

Bibliothek a₁₆ - sense-Strang:

5' Phosphat-**CGGCC** GAG GTT AGC GCG CTG GAA AAG GAG GTG GCC AGT NNK GAG AAA
NNK NNK AGT GCC NNK GAA AAG AAA GTA GCG AGC CTG AAA AAG GAG GTA AGT GCG
TTA GAA **GGCCAGGC** 3'

Bibliothek a₁₆ - antisense-Strang:

5' Phosphat-**TGGCC** TTC TAA CGC ACT TAC CTC CTT TTT CAG GCT CGC TAC TTT CTT TTC
MNN GGC ACT MNN MNN TTT CTC MNN ACT GGC CAC CTC CTT TTC CAG CGC GCT AAC
CTC **GGCCGCCT** 3'

Bibliothek d₁₉ - sense-Strang:

5' Phosphat-**CGGCC** GAG GTT AGC GCG CTG GAA AAG GAG GTG GCC AGT TTA GAG AAA
GAG NNK AGT GCC NNK NNK AAG AAA NNK GCG AGC CTG AAA AAG GAG GTA AGT GCG
TTA GAA **GGCCAGGC** 3'

Bibliothek d₁₉ - antisense-Strang:

5' Phosphat-**TGGCC** TTC TAA CGC ACT TAC CTC CTT TTT CAG GCT CGC MNN TTT CTT MNN
MNN GGC ACT MNN CTC TTT CTC TAA ACT GGC CAC CTC CTT TTC CAG CGC GCT AAC CTC
GGCCGCCT-3'

N: A,C,G, oder T

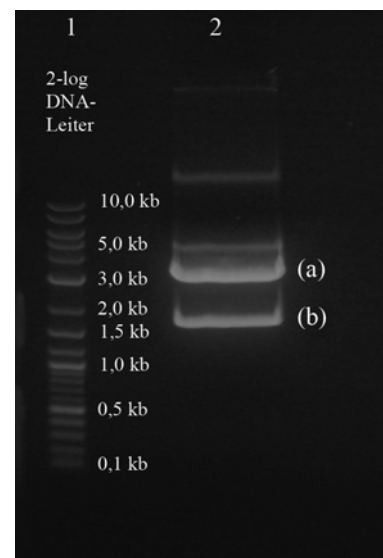
M: A oder C

K: G oder T

7.3.6.1 Ligation und Transformation der Bibliothek

Vektorverdau: 6 µg Vektor pComb3H wurden mit 40U Sfi I in 60 µl NEBuffer 2 + 100 µg/ml BSA 5 h bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf einem 0,7 %igen Agarosegel aufgetrennt und die DNA aus den entsprechenden Gelabschnitten mit Hilfe eines QIAquick® Gel Extraction Kit isoliert (Abbildung 7.4).

Abbildung 7.4. Agarose-Gel des Sfi I-verdauten pComb3H-Vektor. 1) 2-log DNA-Leiter. 2) Sfi I-Verdau. Die Bande bei 3kbp (a) entspricht dem doppelt geschnittenen Vektor, die Bande zw. 1,5 und 2 kbp (b) dem Insert.



Annealing: 3 Ansätze mit jeweils 675 ng der beiden DNA-Stränge in einem Gesamtvolumen von 200 µl *annealing*-Puffer wurden 10 min bei 95 °C inkubiert und anschließend langsam auf 25 °C abgekühlt. Um dabei Konzentrationsänderungen durch die Bildung von Kondensationswasser zu verhindern wurde das *annealing* in einem PCR-Cycler unter Verwendung eines Programms durchgeführt, bei dem die Temperatur des *annealing*-Ansatzes jede Minute um 0,5 °C verringert wurde.

Anschließend wurde die DNA gefällt (7.3.2.2) und der *annealing*-Ansatz auf einem 3% Agarosegel aufgetrennt. Die entsprechenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung eines QIAquick® Gel Extraction Kit isoliert (Abbildung 7.5).

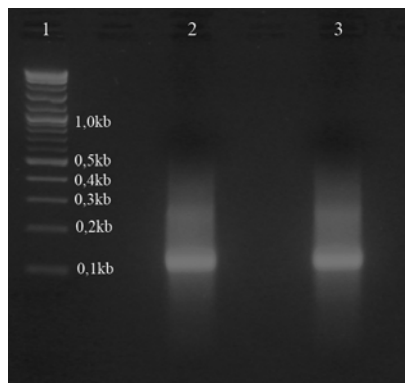


Abbildung 7.5. Agarose-Gel eines annealing-Ansatzes. 1) 2-log DNA-Leiter. 2+3) DNA nach der annealing-Reaktion. Die schwach ausgeprägten Banden bei ca. 0,1 kb entsprechen den korrekt zusammengelagerten DNA-Doppelsträngen.

Ligation: 1 µg doppelsträngige DNA wurden mit 1,5 µg geschnittenem Vektor pComp3H und 4000 U T4 DNA Ligase in 200 µl Ligationspuffer (*T4 DNA Ligase Reaction Buffer*) bei 16 °C ü.N. inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit 150 ng geschnittenem Vektor pComp3H, welcher zusammen mit 400 U T4 DNA Ligase in 20 µl Ligationspuffer unter denselben Bedingungen inkubiert wurde. Nachdem 1 µl des Ligationsansatzes für die Durchführung einer Test-Elektroporation entnommen wurde, wurde die Plasmid-DNA mittels Ethanolfällung gereinigt und in 15 µl Wasser gelöst.

Elektroporation und Herstellung der Bibliotheksphagen: Die gesamten 15 µl isolierten Plasmids (10 min auf Eis vorgekühlt) wurden mit 300 µl frisch aufgetauten elektrokompenten ER2738-Zellen gemischt und in eine 2mm Elektroküvette (ebenfalls 10 min auf Eis vorgekühlt) überführt. Der Ansatz wurde 1 min auf Eis gekühlt und anschließend mit 2,5 kV elektroporiert. Die Zellen wurden sofort mit 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und die Küvette zweimal mit je 1 ml SOC-Medium ausgespült. Die drei Fraktionen wurden zusammen mit weiteren 2 ml vorgewärmtem SOC-Medium in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen vereinigt und 1 h bei 37°C/200rpm inkubiert. Nach der Zugabe von 10 ml vorgewärmtem SB-Medium und Überführung der Kultur in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen wurden 100 µl bzw. 10 µl zur Herstellung einer 10⁻¹ und einer 10⁻² Verdünnung der Kultur entnommen.

Jeweils 50 µl dieser Verdünnungen wurden auf Carbenicillin-Platten (Agarplatten + 100 µg/ml Carbenicillin) ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien auf den Platten wurden gezählt und die Größe der Bibliothek berechnet.

Nach der Zugabe von 3 µl Carbenicillin (100 mg/ml) wurde die Kultur bei 37°C/200rpm inkubiert. Nach 1 h wurden weitere 4,5 µl Carbenicillin (100 mg/ml) zugegeben und erneut eine Stunde bei 37°C/200rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur zusammen mit 183 ml vorgewärmtem SB-Medium, 92,5 µl Carbenicillin (100 mg/ml) sowie 2 ml Helferphagen in einen 500 ml-Zentrifugenbecher überführt. Nach 2h Inkubation bei

37°C/200rpm erfolgte die Zugabe von 280 µl Kanamycin (50 mg/ml) und die Kultur wurde zur Produktion der Bibliotheksphagen ü.N. bei 37°C/200rpm inkubiert.

Die Übernachtskultur wurde 30 min bei 3000 g/4°C zentrifugiert und der Überstand zusammen mit 20 ml (40 Vol%) 20% PEG 8000/2,5M NaCl in einen neuen, vorgekühlten Zentrifugenbecher überführt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Phagen 30 min bei 12000 g/4°C (Maximum des GS3-Rotors) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 10 min an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 2 ml PBS-Puffer resuspendiert und steril filtriert (0,22 µm-Filter). Nach der Zugabe von Natriumazid (Endkonzentration 0,02% (w/v)) wurde die Phagenbibliothek bei 4°C gelagert.

7.3.6.2 Ligation und Transformation nicht randomisierter DNA

Zur Klonierung nicht randomisierter DNA sowie zur Bestimmung der Diversität der Bibliotheks-DNA wurde folgendes, vereinfachtes Protokoll verwendet.

Vektorverdau: 6 µg Vektor pComb3H wurden mit 40U Sfi I in 60 µl NEBuffer 2 + 100 µg/ml BSA 5h bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt und die DNA aus den entsprechenden Gelabschnitten mit Hilfe eines *QIAquick® Gel Extraction Kit* isoliert.

Annealing: Jeweils 45 ng der beiden DNA-Stränge wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl *annealing*-Puffer 15 min bei 95°C inkubiert und dabei mehrmals kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe im ausgeschalteten Heizblock langsam auf RT abgekühlt und ohne weitere Reinigung für die Ligation verwendet.

Ligation: 50 ng doppelsträngige DNA wurden mit 100 ng geschnittenem Vektor pComp3H und 200 U T4 DNA Ligase in einem Endvolumen von 10 µl Ligationspuffer (*T4 DNA Ligase Reaction Buffer*) ü.N. bei 16 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz von 100 ng geschnittenem Vektor pComp3H welcher zusammen mit 200U T4 DNA Ligase in einem Endvolumen von 10 µl Ligationspuffer unter denselben Bedingungen inkubiert wurde.

Elektroporation: 1 µl des Ligationsansatzes (10 min auf Eis vorgekühlt) wurde mit 50 µl frisch aufgetauten elektrokompetenten ER2738-Zellen gemischt und in eine vorgekühlte 2mm Elektroküvette überführt. Der Ansatz wurde 1 min auf Eis gekühlt, anschließend mit 2,5kV elektroporiert und die Zellen sofort in 900 µl vorgewärmtem SOC-Medium

aufgenommen. Nach 20 min bei 37°C/200rpm wurden 10 µl bzw. 100 µl der Kultur auf Carbenicillin-Agarplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Die die gewünschte DNA enthaltenden Bakterienkolonien wurden mittels PCR-Scan und anschließender DNA-Sequenzierung identifiziert.

7.3.7 Produktion rekombinanter Phagen

50 µl elektrokompente ER2738-Zellen wurden in einem 500 ml-Zentrifugenbecher in 50 ml vorgewärmtem SB-Medium suspendiert und bei 37°C/200rpm inkubiert. Nach dem Erreichen einer optische Dichte von $OD_{600nm} = 1$ (ca. 2,5 h) wurde die Kultur mit 50 µl der Phagenbibliothek infiziert. Nach 15 min bei RT wurde die Kultur mit 10 µl Carbenicillin (100 mg/ml) und nach 1h bei 37°C/200rpm mit weiteren 15 µl Carbenicillin versetzt. Nach einer weiteren Stunde bei 37°C/200rpm erfolgte die Zugabe von 148 ml vorgewärmtem SB-Medium + 75 µl Carbenicillin (100 mg/ml) sowie von 2 ml Helferphagen. Nach 2h bei 37°C/200rpm erfolgte die Zugabe von 280 µl Kanamycin (50 mg/ml). Anschließend wurde und die Kultur ü.N. bei 37°C/200rpm ü.N. inkubiert.

Die Übernachtskultur wurde 30 min bei 3000g/4°C zentrifugiert und der Überstand zusammen mit 40 ml (20 Vol%) 20% PEG 8000/2,5M NaCl in einen neuen, vorgekühlten Zentrifugenbecher überführt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Phagen 30 min bei 12000g/4°C (Maximum des GS3-Rotors) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 10 min an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 2 ml PBS-Puffer resuspendiert, steril filtriert (0,22µm Filter) und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

7.3.8 Panning

Für die Durchführung der als *panning* bezeichneten Bindungs- und Selektionsrunden wurden ausschließlich frisch präparierte Phagen verwendet, welche durch Reinfektion mit der Phagenbibliothek wie unter 7.3.7 beschrieben gewonnen wurden.

Selektion: Zur Immobilisierung des Zilopeptids wurden 30 µl DynaBeads (Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel) zusammen mit 500 µl 10 µM biotinyliertem Peptid in PBS-Puffer 45 min bei RT/750 rpm inkubiert. Die Partikel wurden zweimal mit je 500 µl PBS-T gewaschen und anschließend für 45 min bei RT/750 rpm mit 500 µl 5%iger Milchpulverlösung (in PBS-Puffer) inkubiert. Die Milchpulverlösung wurde abpipettiert und

die Partikel mit 250 µl PBS-Puffer sowie 250 µl frisch präparierter Phagensuspension versetzt. Nach 1,5 h bei RT/750 rpm wurden die Partikel von der Phagensuspension getrennt und gewaschen. Dabei unterschied sich die Waschprozedur zwischen den unterschiedlichen Selektionsrunden. Gewöhnlich wurden fünf Selektionsrunden durchgeführt, wobei in der ersten Runde viermal mit je 500 µl PBS-T sowie einmal mit TBS-Puffer gewaschen wurde. Diese Prozedur wurde für das *panning* mit der VPK-Variante VPK-E₁₉ für die Selektionsrunden 1-4 beibehalten. Für alle anderen VPK-Varianten wurde in der zweiten bis vierten Runde mit je 500 µl 1% Tween20 in PBS sowie einmal mit TBS-Puffer gewaschen. In der fünften Runde wurde der Selektionsdruck ein weiteres Mal erhöht indem zweimal mit 1% Tween20 in PBS, zweimal mit 1M GndHCl in PBS (pH 7,4) sowie einmal mit TBS-Puffer gewaschen wurde. Während der Selektion gegen VPK-E₁₉ wurden in der fünften Runde die Partikel nach der Bindungsreaktion viermal mit 0,2% Tween20 und einmal mit TBS gewaschen.

Reinfektion: Für jeden Ansatz wurden 10 µl elektrokompetente *E.coli* ER2738 in 5 ml vorgewärmtem SB-Medium suspendiert und 2 h bei 37°C/200 rpm inkubiert. Die gewaschenen magnetischen Partikel aus dem *panning* wurden mit 25 µl frisch hergestellter Trypsinlösung (10 mg/ml in TBS) versetzt. Nach 30 min bei RT/750 rpm wurde die Reaktion durch Zugabe von 80 µl SB-Medium gestoppt. Für die Reinfektion wurden 5 ml *E.coli*-Kultur mit 100 µl Phagensuspension versetzt und 30 min bei 37°C/200 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 ml vorgewärmtem SB-Medium sowie von 2 µl Carbenicillin (100 mg/ml). Nach 1h bei 37°C/200rpm wurde die Kultur zusammen mit 90 ml vorgewärmtem SB-Medium, 46 µl Carbenicillin (100 mg/ml) sowie 1 ml Helferphagen in einen 200 ml-Zentrifugenbecher überführt und weitere 1,5 h bei 37°C/200rpm inkubiert. Nach der Zugabe von 140 µl Kanamycin (50 mg/ml) wurde die Kultur ü.N. bei 37°C/200rpm inkubiert.

Die Übernachtskultur wurde 30 min bei 3000g/4°C (GSA-Rotor) zentrifugiert und der Überstand zusammen mit 20 ml (20 Vol%) 20% PEG 8000/2,5M NaCl in einen neuen, vorgekühlten Zentrifugenbecher überführt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Phagen 30 min bei 15000g/4°C (GSA-Rotors) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 10 min an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert, steril filtriert (0,22 µm Filter) und bis zum *panning* auf Eis gelagert.

Bestimmung des Phagentiters: Jeweils 50 µl einer 10⁻¹- und einer 10⁻²-Verdünnung der infizierten *E.coli*-Kultur wurden auf Carbenicillin-Agar-Platten ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung des Input-Titers wurden 50 µl *E.coli*-Kultur mit 1 µl einer

10^{-6} -Verdünnung der für das panning eingesetzten Phagensuspension versetzt und 20 min bei RT/750rpm inkubiert. Die infizierte *E.coli*-Kultur wurde anschließend auf eine Carbenicillin-Agar-Platte ausgestrichen und diese ü.N. bei 37°C inkubiert.

8 Literatur

- ¹ S. Lien, H.B. Lowman, *Trends Biotechnol.* **2003**, 21, 556-562.
- ² A.K. Sato, M. Viswanathan, R.B. Kent, C.R. Wood, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, 17, 638-642.
- ³ A. Hüther, U. Dietrich, *AIDS Rev.* **2007**, 9, 208-17.
- ⁴ T. Matthews, M. Salgo, M. Greenberg, J. Chung, R. DeMasi, D. Bolognesi, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, 3, 215-225.
- ⁵ B. Permanne, C. Adessi, G.P. Saborio, S. Fraga, M.-J. Frossard, J.van Dorpe, I. Dewachter, W.A. Banks, F. van Leuven, C. Soto, *FASEB J.* **2002**, 16, 860-862.
- ⁶ C. Falciani, L. Lozzi, A. Pini, L. Bracci, *Chem.Biol.* **2005**, 12, 417-426.
- ⁷ R. David, R. Günther, L. Baumann, T. Lühmann, D. Seebach, H.-J. Hofmann, A.G. Beck-Sickingher, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 15311-15317.
- ⁸ B. D. Welch, A. P. VanDenmark, A. Heroux, C.P. Hill, M.S. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **2007**, 104, 16828-16833.
- ⁹ D.A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 645-652.
- ¹⁰ I. Ojima, *ChemBioChem* **2004**, 5, 628-635.
- ¹¹ H.J. Böhm, D. Banner, S. Bendels, H. Kansy, B. Kuhn, K. Müller, U. Obst-Sander, M. Stahl, *ChemBioChem* **2004**, 5, 637-643.
- ¹² P. Jeschke, *ChemBioChem* **2004**, 5, 570-589.
- ¹³ C.D. Murphy, C. Schaffrath, D. O'Hagan, *Chemosphere* **2003**, 52, 455-461.
- ¹⁴ H. Deng, D. O'Hagan, C. Schaffrath, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, 21, 773-784.
- ¹⁵ J.-P. Bégué, D. Bonnet-Deplon, *J. Fluorine Chem.* **2006**, 127, 992-1012.
- ¹⁶ C. Isanbor, D. O'Hagan, *J. Fluorine Chem.* **2006**, 127, 303-319.
- ¹⁷ K. Müller, C. Faeh, F. Diederich, *Science* **2007**, 317, 1881-1886.
- ¹⁸ P.G.W. Gettins, *Int. J. Biol. Macromol.* **1994**, 16, 227-235.
- ¹⁹ D. Le Bars, *J. Fluorine Chem.* **2006**, 127, 1488-1493.
- ²⁰ V.S.Gorelik, A.V. Chervyakov, L.I. Zlobina, O.N. Sharts, *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering* **1999**, 3855, 16-27.
- ²¹ B.K. Park, N.R. Kitteringham, P.M. O'Neill, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, 41, 443-470.
- ²² J.-P. Bégué, D. Bonnet-Deplon, *Bioorganic and Medical Chemistry of Fluorine*, John Wiley & Sons, Inc. **2008**. 1-22.
- ²³ G.A. Patani, E.J. LaVoie, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 3147-3176.
- ²⁴ A. Bondi, *J. Phys. Chem.* **1964**, 68, 441-451.
- ²⁵ D. O'Hagan, H.S. Rzepa, *Chem. Commun.* **1997**, 645-652.
- ²⁶ B.E. Smart, *J. Fluorine Chem.* **2001**, 109, 3-11.

- ²⁷ F. Leroux, *ChemBioChem* **2004**, 5, 644-649.
- ²⁸ M. Schlosser, D. Michel, *Tetrahedron* **1996**, 52, 99-108.
- ²⁹ J.J. Urban, B.G. Tillman, W.A. Cronin, *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110, 11120-11129.
- ³⁰ K. Zhao, D.S. Lim, T. Funaki, J.T. Welch, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 207-215.
- ³¹ S. Couve-Bonnaire, D. Cahard, X. Pannecoucke, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 1151-1157.
- ³² W. C. Black, C.I. Bayly, D.E. Davis, S. Desmarais, J.-P. Falguyret, S. Léger, C.S. Li, F. Massé, D.J. McKay, J.T. Palmer, M.D. Percival, J. Robichaud, N. Tsou, R. Zamboni, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 4741-4744.
- ³³ S.C. Annedi, W. Li, S. Samson, L.P. Kotra, *J. Org. Chem.* **2003**, 3, 1043-1049.
- ³⁴ S. Bigotti, S.V. Meille, A. Volonterio, M. Zanda, *J. Fluorine Chem.* **2008**, 129, 767-774.
- ³⁵ J.D. Dunitz, *ChemBioChem* **2004**, 5, 614-621.
- ³⁶ J.A.K. Howard, V.J. Hoy, D. O'Hagan, G.T. Smith, *Tetrahedron* **1996**, 52, 12163-12622.
- ³⁷ J.D. Dunitz, R. Taylor, *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 89-98.
- ³⁸ T.J. Barbarich, C.D. Rither, S.M. Miller, O.P. Anderson, S.H. Strauss, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4280-4281.
- ³⁹ G. Haufe, T.C. Rosen, O.G.J. Meyer, R. Fröhlich, K. Rissanen, *J. Fluorine Chem.* **2002**, 114, 189-198.
- ⁴⁰ M. Schlosser, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1496-1513.
- ⁴¹ H.-J. Böhm, D. Banner, S. Bendels, M. Kansy, B. Kuhn, K. Müller, U. Obst-Sander, M. Stahl, *ChemBioChem* **2004**, 5, 637-643.
- ⁴² D. Xu, C.-J. Tsai, R. Nussinov, *Prot. Eng., Des. Sel.* **1997**, 10, 999-1012.
- ⁴³ D. Xu, S.L. Lin, R. Nussinov, *J. Mol. Biol.* **1997**, 265, 68-84.
- ⁴⁴ J.A. Erickson, J.I. McLoughlin, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 1626-1631.
- ⁴⁵ M. Morgenthaler, E. Schweizer, A. Hoffmann-Röder, F. Benini, R.E. Martin, G. Jaeschke, B. Wagner, H. Fischer, S. Bendels, D. Zimmerli, J. Schneider, F. Diederich, M. Kansy, K. Müller, *ChemMedChem* **2007**, 2, 1100-1115.
- ⁴⁶ M.B. van Niel, I. Collins, M.S. Beer, H.B. Broughton, S.K.F. Cheng, S.C. Godacre, A. Heald, K.L. Locker, A.M. MacLeod, D. Morrison, C.R. Moyes, D. O'Connor, A. Pike, M. Rowley, M.G.N. Russell, B. Sohal, J.A. Stanton, S. Thomas, H. Verrier, A.P. Watt, J.L. Castro, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2087-2104.
- ⁴⁷ E.N.G. Marsh, *Chem. Biol.* **2000**, 7, R153-R157.
- ⁴⁸ Z. Luo, Q. Zhang, Y. Oderaotoshi, D.P. Curran, *Science* **2001**, 291, 1766-1769.
- ⁴⁹ A.P. Dobbs, M.R. Kimberley, *J. Fluorine Chem.* **2002**, 118, 3-17.
- ⁵⁰ N.C. Yoder, K. Kumar, *Chem. Soc. Rev.* **2002**, 31, 335-341.
- ⁵¹ B.D. Key, R.D. Howell, C.S. Criddle, *Environ. Sci. Technol.* **1997**, 31, 2445-2454.
- ⁵² D. O'Hagan, D.B. Harper, *J. Fluorine Chem.* **1999**, 100, 127-133.
- ⁵³ J.T.G. Hamilton, D.B. Harper, *Phytochemistry* **1997**, 44, 1129-1132.

- ⁵⁴ K.A. Reid, J.T.G. Hamilton, R.D. Bowden, D. O'Hagan, L. Dasaradhi, M.R. Amin, D.B. Harper, *Microbiology* **1995**, 141, 1385-1393.
- ⁵⁵ C. Schaffrath, S.L. Cobb, D. O'Hagan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3913-3915.
- ⁵⁶ D. O'Hagan, C. Schaffrath, S.L. Cobb, J.T.G. Hamilton, C.D. Murphy, *Nature* **2002**, 416, 279.
- ⁵⁷ C. Dong, F. Huang, H. Deng, C. Schaffrath, J.B. Spencer, D. O'Hagan, J.H. Naismith, *Nature* **2004**, 427, 561-565.
- ⁵⁸ K. Barlos, D. Gatos, *Biopolymers* **1999**, 51, 266-278.
- ⁵⁹ C.P.R. Hakenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 10030-10074.
- ⁶⁰ S.B.H. Kent, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 338-351.
- ⁶¹ M. Leone, R.A. Rodriguez-Mias, M. Pellecchia, *ChemBioChem* **2003**, 4, 649-662.
- ⁶² E. Yoshikawa, M.J. Fournier, T.L. Mason, D.A. Tirerell, *Macromolecules* **1994**, 27, 5471-5475.
- ⁶³ B. Brooks, R.S. Phillips, W.F. Benisek, *Biochemistry* **1998**, 37, 9738-9742.
- ⁶⁴ J. Broos, E. Gabellieri, E. Biemans-Oldehinkel, G.B. Strambini, *Protein Sci.* **2003**, 12, 1991-2000.
- ⁶⁵ H. Dewel, E. Daub, V. Robinson, J.F. Honek, *Biochemistry* **1997**, 36, 3404-3416.
- ⁶⁶ Y. Tang, G. Ghirlanda, W.A. Petka, T. Nakajima, W.F. DeGrado, D.A. Tirell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 1494-1496.
- ⁶⁷ J.K. Montclare, S. Son, G.A. Clark, K. Kumar, D.A. Tirell, *ChemBioChem* **2009**, 10, 84-86.
- ⁶⁸ J. Tang, A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 11089-11090.
- ⁶⁹ C.J. Noren, S.J. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, P.G. Schultz, *Science* **1989**, 244, 182-188.
- ⁷⁰ J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlain, E.S. Diala, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8013-8014.
- ⁷¹ L. Bossi, J.R. Roth, *Nature* **1980**, 286, 123-127.
- ⁷² V.W. Cornish, D. Mendel, P.G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 621-633.
- ⁷³ P.M. England, *Biochemistry* **2004**, 43, 11623-11629.
- ⁷⁴ R. Furter, *Protein Sci.* **1998**, 7, 419-426.
- ⁷⁵ N. Budisa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6426-6463.
- ⁷⁶ L. Wang, P.G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 34-66.
- ⁷⁷ J.C. Jackson, J.T. Hammill, R.A. Mehl, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1160-1166.
- ⁷⁸ J.T. Hammill, S. Miyake-Stoner, J.L. Hazen, C. Jackson, R.A. Mehl, *Nature Protocols* **2007**, 2, 2601-2607.
- ⁷⁹ S.E. Cellitti, D.H. Jones, L. Lagpacan, X. Hao, Q. Zhang, H. Hu, S.M. Brittain, A. Brinker, J. Caldwell, B. Bursulaya, G. Spraggon, A. Brock, Y. Ryu, T. Uno, P.G. Schultz, B.H. Geierstanger, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9268-9281.

- ⁸⁰ J.T. Gerig, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, 26, 293-370.
- ⁸¹ M.A. Danielson, J.J. Falke, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, 25, 163-195.
- ⁸² R. Campos-Olivas, R. Aziz, G.L. Helms, J.N.S. Evans, A.M. Gronenborn, *FEBS Lett.* **2002**, 517, 55-60.
- ⁸³ Q. Shu, C. Frieden, *Biochemistry* **2004**, 43, 1432-1439.
- ⁸⁴ A.S. Ulrich, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, 46, 1-21.
- ⁸⁵ P.K. Mikhailiuk, S. Afonin, A.N. Chernega, E.B. Rusanov, M.O. Platonov, G.G. Dubinina, M. Berditsch, A.S. Ulrich, I.V. Komarov, *Angw. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5659-5661.
- ⁸⁶ U.H.N. Dürr, S.L. Grage, R. Witter, A.S. Ulrich, *J. Magn. Reson.* **2008**, 191, 7-15.
- ⁸⁷ S.L. Grage, U.H.N. Dürr, S. Afonin, P.K. Mikhailiuk, I.V. Komarov, A.S. Ulrich, *J. Magn. Reson.* **2008**, 191, 16-23.
- ⁸⁸ S. Afonin, R.W. Glaser, M. Berditchevska, P. Wadhvani, K.-H. Gührs, U. Möllmann, A. Perner, A.S. Ulrich, *ChemBioChem* **2003**, 4, 1151-1163.
- ⁸⁹ R.W. Glaser, C. Sachse, U.H.N. Dürr, P. Wadhvani, A.S. Ulrich, *J. Magn. Reson.* **2004**, 168, 153-163.
- ⁹⁰ S. Afonin, P.K. Mikhailiuk, I.G. Komarov, A.S. Ulrich, *J. Pept. Sci.* **2007**, 13, 614-623.
- ⁹¹ S. Afonin, U.H.N. Dürr, R.W. Glaser, A.S. Ulrich, *Magn. Reson. Chem.* **2004**, 42, 195-203.
- ⁹² K.A. Brogden, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 238-250.
- ⁹³ M. Zasloff, *Nature* **2002**, 415, 389-395.
- ⁹⁴ D. Giménez, C. Andreu, M. del Olmo, T. Varea, D. Diaz, G. Asensio, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14, 6971-6978.
- ⁹⁵ A. Niemz, D. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7407-7413.
- ⁹⁶ L.M. Gottler, H.-Y. Lee, C.E. Shelburne, A. Ramamoorthy, E.N.G. Marsh, *ChemBioChem* **2008**, 9, 370-373.
- ⁹⁷ H. Meng, K. Kumar, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 15615-15622.
- ⁹⁸ B. Koksich, N. Sewald, H.-J. Hofmann, K. Burger, H.-D. Jakubke, *J. Pept. Sci.* **1997**, 3, 157-167.
- ⁹⁹ H. Meng, S.T. Krishnaji, M. Beindorn, K. Kumar, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 7303-7307.
- ¹⁰⁰ M.L. DeRider, S.J. Wilkens, M.J. Waddell, L.E. Bretscher, F. Weinhold, R.T. Raines, J.L. Markley, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2497-2505.
- ¹⁰¹ S.K. Holmgren, L.E. Bretcher, K.M. Taylor, R.T. Raines, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 63-70.
- ¹⁰² R. Berisio, L. Vitagliano, L. Mazzarella, A. Zagari, *Protein Sci.* **2002**, 11, 262-270.
- ¹⁰³ L.E. Bretscher, C.L. Jenkins, K.M. Taylor, M.L. DeRider, R.T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 777-778.
- ¹⁰⁴ J.A. Hodges, R.T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9262-9263.
- ¹⁰⁵ M. Doi, Y. Nishi, S. Uchiyama, Y. Nishiuchi, T. Nakazawa, T. Ohkubo, Y. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9922-9923.

- ¹⁰⁶ J.A. Hodges, R.T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15923-15932.
- ¹⁰⁷ W. Kim, R.A. McMillan, J.P. Snyder, V.P. Conticello, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 18121-18132
- ¹⁰⁸ T. Steiner, P. Hess, J.H. Bae, B. Wiltschi, L. Moroder, N. Budisa, *PLoS One* **2008**, 3, e1680.
- ¹⁰⁹ M.A. Elsliger, R.M. Wachter, G.T. Hanson, K. Kallio, S.J. Remington, *Biochemistry* **1999**, 38, 5296-5301.
- ¹¹⁰ T. Kitamoto, T. Ozawa, M. Abe, S. Marubayashi, T. Yamazaki, *J. Fluorine Chem.* **2008**, 129, 286-293.
- ¹¹¹ M. Hakelberg, B. Kokschi, *Chemistry Today*, **2007**, 25, 48-53.
- ¹¹² Y. Tang, G. Ghirlanda, N. Vaidehi, J. Kua, D.T. Mainz, W.A. Goddard III, W.F. DeGrado, D.A. Tirrell, *Biochemistry* **2001**, 40, 2790-2796.
- ¹¹³ B. Bilgiçer, A. Fichera, K. Kumar, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4393-4399.
- ¹¹⁴ G. Grigoryan, A.E. Keating, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, 18, 477-483.
- ¹¹⁵ S. Son, C. Tanrikulu, D.A. Tirrell, *ChemBioChem* **2006**, 7, 1251-1257.
- ¹¹⁶ Z.Luo, Q. Zhang, Y. Oderaotoshi, D.P. Curran, *Science* **2001**, 291, 1766-1769.
- ¹¹⁷ N.C. Yoder, D. Yüksel, L. Dafik, K. Kumar, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 576-583.
- ¹¹⁸ B. Bilgiçer, A. X. Xing, K. Kumar, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 11815-11816.
- ¹¹⁹ B. Bilgiçer, K. Kumar, *Tetrahedron* **2002**, 58, 4105-4112.
- ¹²⁰ B. Bilgiçer, K. Kumar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 15324-15329.
- ¹²¹ N. Naarmann, B. Bilgiçer, H. Meng, K. Kumar, C. Steinem, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2588-2591.
- ¹²² J.-C. Horng, D.P. Raleigh, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9286-9287.
- ¹²³ K.-H. Lee, H.-Y. Lee, M.M. Slutsky, J.T. Anderson, E.N.G. Marsh, *Biochemistry* **2004**, 43, 16277-16284.
- ¹²⁴ H.Y. Lee, K.H. Lee, H.M. Al-Hashimi, E.N.G. Marsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 337-343.
- ¹²⁵ L.M. Gottler, R. de la Salud-Bea, E.N.G. Marsh, *Biochemistry* **2008**, 47, 4484-4490.
- ¹²⁶ P. Luo, R.L. Baldwin, *Biochemistry* **1997**, 36, 8413-8421.
- ¹²⁷ D. Roccatano, G. Colombo, M. Fioroni, A.E. Mark, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2002**, 99, 12179-12184.
- ¹²⁸ T. Panchenko, W.W. Zhu, J.K. Montclare, *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, 94, 921-930.
- ¹²⁹ C.Jäckel, P. Kast, D. Hilvert, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, 37, 153-173
- ¹³⁰ J.K. Montclare, D.A. Tirrell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4518-4521.
- ¹³¹ T.H. Yoo, J. Link, D.A. Tirrell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2007**, 104, 13887-13890.
- ¹³² C. Minks, R. Huber, L. Moroder, N. Budisa, *Biochemistry* **1999**, 38, 10649-10659.
- ¹³³ C. Jäckel, W. Seufert, S. Thust, Beate Kokschi, *ChemBioChem* **2004**, 5, 717-720.

- ¹³⁴ G. Cornilescu, E.B. Hadley, M.G. Woll, J.L. Markley, S.H. Gellman, C.C. Cornilescu, *Protein Sci.* **2007**, 16, 14-19.
- ¹³⁵ T. Matsuura, T. Yomo, *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, 101, 449-456.
- ¹³⁶ G.P. Smith, V.A. Petrenko, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 391-410.
- ¹³⁷ M. Paschke, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 70, 2-11.
- ¹³⁸ J.R. Lai, J.D. Fisk, B. Weisblum, S.H. Gellmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10514-10515.
- ¹³⁹ U.B. Hagemann, J.M. Mason, K.M. Müller, K.M. Arndt, *J. Mol. Biol.* **2008**, 381, 73-88.
- ¹⁴⁰ S.Y. Lee, J. H. Choi, Z. Xu, *Trends Biotechnol.* **2003**, 21, 45-52.
- ¹⁴¹ A. Kondo, M. Ueda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, 64, 28-40.
- ¹⁴² D. Lipovsek, A. Plückthun, *J. Immunol. Methods* **2004**, 290, 51-67.
- ¹⁴³ *Phage Display: A Laboratory Manual* (Eds.: C.F. Barbas III, D.R. Burton, J.K. Scott, G.J. Silverman), Cold Spring Harbor Laboratory Press **2001**. 1.1-1.37.
- ¹⁴⁴ J. W. Kehoe, B. K. Kay, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 4056-4072.
- ¹⁴⁵ C.F. Barbas III, J. Wagner, *Methods* **1995**, 8, 94-103.
- ¹⁴⁶ C.F. Barbas III, A.S. Kang, R.A. Lerner, S.J. Benkovic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 7978-7982.
- ¹⁴⁷ P. Burkhard, J. Stetefeld, S.V. Strelkov, *Trends Cell Biol.* **2001**, 11, 82-88.
- ¹⁴⁸ J.M. Mason, K.M. Arndt, *ChemBioChem.* **2004**, 5, 170-176.
- ¹⁴⁹ D.N. Woolfson, *Adv. Protein Chem.* **2005**, 70, 79-112.
- ¹⁵⁰ R.D.B. Fraser, T.P. Macrae, G.E. Rogers, *Nature* **1962**, 193, 1052-1055.
- ¹⁵¹ D.C. Chan, D. Fass, J.M. Berger, P.S. Kim, *Cell* **1997**, 89, 263-273.
- ¹⁵² W. Weissenhorn, A. Dessen, S.C. Harrison, J.J. Skehel, D.C. Wiley, *Nature* **1997**, 387, 426-430.
- ¹⁵³ E.K. O'Shea, J.D. Klemm, P.S. Kim, T. Alber, *Science* **1991**, 254, 539-544.
- ¹⁵⁴ C. Jäckel. *Development of a Screening System for the Systematic Evaluation of the Interactions of Fluoroalkyl-Substituted Amino Acids in Polypeptide Environments*. Dissertation, Freie Universität Berlin, **2006**.
- ¹⁵⁵ S.Y. Venyaminov, J.T. Yang in G.D. Fasman (Ed.) *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* Plenum Press: New York **1996**, 69-107.
- ¹⁵⁶ J.R. Litowski, R.S. Hodges, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 37272-37279.
- ¹⁵⁷ J. Moitra, L. Szilák, D. Krylov, C. Vinson, *Biochemistry* **1997**, 36, 12567-12573.
- ¹⁵⁸ E.K. O'Shea, K.J. Lumb, P.S. Kim, *Curr. Biol.* **1993**, 3, 658-667.
- ¹⁵⁹ P.Y. Chou, G.D. Fasman, *Biochemistry* **1974**, 13, 211-222.
- ¹⁶⁰ P.Y. Chou, G.D. Fasman, *Biochemistry* **1974**, 13, 222-245.
- ¹⁶¹ J. Reed, T.A. Reed, *Anal. Biochem.* **1997**, 254, 36-40.

- ¹⁶² P. Wu, L. Brand, *Anal. Biochem.* **1994**, 218, 1-13.
- ¹⁶³ K. Pagel, K. Seeger, B. Seiwert, A. Villa, A. E. Mark, S. Berger, B. Kokschi, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1189-1194.
- ¹⁶⁴ M. Meldal, K. Breddam, *Anal. Biochem.* **1991**, 195, 141-147.
- ¹⁶⁵ U. Hassiepen, M. Federwisch, T. Mülders, V.J. Lenz, H.G. Gattner, P. Krüger, A. Wollmer, *Eur. J. Biochem.* **1998**, 255, 580-587.
- ¹⁶⁶ J. O. Duus, M. Meldal, J.R. Winkler, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 6413-6418.
- ¹⁶⁷ M. Salwiczek, S. Samsonov, T. Vagt, C. Baldauf, E. Nyakatura, E. Fleige, J. Numata, H. Cölfen, M. T. Pisabarro, and B. Kokschi, *Chem. Eur. J.* **2009**, doi: 10.1002/chem.200802136.
- ¹⁶⁸ B.Q. Qiang, I. Schildkraut, *Nucl. Acids Res.* **1984**, 12, 4507-4516.
- ¹⁶⁹ B.-Y. Zhu, N.E. Thou, C.M. Kay, R.S. Hodges, *Protein Sci.* **1993**, 2, 383-394.
- ¹⁷⁰ K. Wagschal, B. Tripet, P. Lavigne, C. Mant, R.S. Hodges, *Protein Sci.* **1999**, 8, 2312-2329.
- ¹⁷¹ M.G. Oakley, P.S. Kim, *Biochemistry* **1998**, 37, 12603-12610.
- ¹⁷² L. Gonzales Jr., D.N. Woolfson, T. Alber, *Nature Struct. Biol.* **1996**, 3, 1011-1018.
- ¹⁷³ B. Tripet, K. Wagschal, P. Lavigne, C.T. Mant, R.S. Hodges, *J. Mol. Biol.* **2000**, 300, 377-402.
- ¹⁷⁴ A. Acharya, V. Rishi, C. Vinson, *Biochemistry* **2006**, 45, 11324-11332.
- ¹⁷⁵ C. Jäckel, M. Salwiczek, B. Kokschi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4198-4203.
- ¹⁷⁶ F. Schäfer, D. Deluca, U. Majdic, J. Kirchner, M. Schliwa, L. Moroder, G. Woehlke, *EMBO J.* **2003**, 22, 450-458.
- ¹⁷⁷ S.K. Burley, G.A. Petsko, *FEBS Lett.* **1986**, 203, 139-143.
- ¹⁷⁸ N.S. Scrutton, A.R.C. Raine, *Biochem. J.* **1996**, 319, 1-8.
- ¹⁷⁹ J.P. Gallivan, D.A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 9459-9466.
- ¹⁸⁰ W.J. van Heekeren, J.W. Sellers, K. Struhl, *Nucleic Acids Research* **1992**, 20, 3721-3724.
- ¹⁸¹ O.D. Monera, N.E. Zhou, C.M. Kay, R.S. Hodges, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 19218-19227.
- ¹⁸² H. Cölfen, S. E. Harding, *Eur. Biophys. J.* **1997**, 25, 333-346.
- ¹⁸³ T. Vagt, C. Jäckel, S. Samsonov, M.T. Pisabarro, B. Kokschi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *in press*, doi: 10.1016/j.bmcl.2009.03.062.
- ¹⁸⁴ J.P. Schneider, J.D. Lear, W.F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5742-5743.
- ¹⁸⁵ J.K. Kretsinger, J.P. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7907-7913.
- ¹⁸⁶ M.L. Diss, A.J. Kennan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 1321-1327.
- ¹⁸⁷ K. Beck, J.E. Gambee, A. Kamawal, H.P. Bächinger, *EMBO J.* **1997**, 16, 3767-3777.
- ¹⁸⁸ N.A. Schnarr, A.J. Kennan, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14447-14451.
- ¹⁸⁹ D. Winkler, K. Burger, *Synthesis* **1996**, 12, 1419-1421.
- ¹⁹⁰ S.N. Osipov, T. Lange, P. Tsouker, J. Spengler, L. Hennig, B. Kokschi, S. Berger, S.M. El-Kousy, K. Burger, *Synthesis* **2004**, 11, 1821-1829.

¹⁹¹ T. Tsushima, K. Kawada, S. Ishihara, N. Uchida, O. Shiratori, J. Higaki, M. Hirata, *Tetrahedron* **1988**, 44, 5375-5387.

¹⁹² L.A. Carpino, G.Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5748-5749.

¹⁹³ E. Kaiser, R.L. Colescott, C.D. Bossinger, P.I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, 34, 595-598.

¹⁹⁴ D.L. Allen, G.J. Pielak, *Protein Sci.* **1998**, 7, 1262-1263.

¹⁹⁵ <http://www.rasmb.bbri.org>

¹⁹⁶ J. Lebowitz, M.S. Lewis, P. Schuck, *Protein Sci.* **2002**, 11, 2067-2079.

¹⁹⁷ P. Schuck, *Biophys. J.* **2000**, 78, 1606-1619.