

# Inhibition von Protein-Protein-Wechselwirkungen: Peptidomimetika für VASP-EVH1

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

DIPL.-BIOPHYS. ROBERT OPITZ  
aus Dresden

2012



Die Arbeit wurde von 01.2007 bis 03.2012 unter der Leitung von Prof. Dr. H. Oschkinat und Dr. R. Kühne am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Oschkinat
2. Gutachter: Jun. Prof. Dr. S. Keller

Disputation am 03.12.2012



## Zusammenfassung

Die Mitglieder der Ena/VASP-Proteinfamilie sind an der Modulation des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen beteiligt und wirken in verschiedenen Prozessen wie der Zellbeweglichkeit und der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten mit und gelten zudem als einflussreiche Faktoren bei der Ausbildung invasiver Tumorzellen. Über eine Protein-Protein-Interaktion vermitteln die in allen Ena/VASP-Proteinen enthaltene N-terminal gelegene EVH1- und C-terminal gelegene EVH2-Domäne einen Kontakt zwischen membranassoziierten Proteinen, wie Lamellopodin, Zyxin oder Vinculin (EVH1) und dem (+)-Ende eines Aktinfilaments (EVH2). Eine Störung der EVH1-Interaktion durch einen Inhibitor sollte daher einen modulierenden Effekt auf die Mikrofilamentsynthese erzielen und so bspw. die Aggressivität invasiver Tumorzellen günstig beeinflussen. Wir entwickelten dazu erfolgreich verschiedene Peptidomimetika zur Inhibition der EVH1-Domäne, speziell für das Vasodilatator-Stimulierte Phosphoprotein (VASP). Es zeigte sich, dass diese Liganden auch die anderen Mitglieder der Ena/VASP-Familie erreichten. Einige der von uns erzeugten Liganden banden mit einer Dissoziationskonstante im hohen nanomolaren Bereich, wobei wir auch Liganden mit einem Molekulargewicht von ca. 750 Dalton erzeugen konnten und dabei immer noch eine Affinität wie für die bestbindenden bekannten Peptidliganden der EVH1-Domänen der Ena/VASP-Familie erhielten.

## Abstract

The members of the Ena/VASP protein family are involved in modulation of the cytoskeleton of eukaryotic cells and participate in different processes like cell motility and cell-cell junctions. They are also known as important factors in development of invasive tumor cells. All Ena/VASP proteins contains a N-terminal EVH1 domain and a C-terminal EVH2 domain, which are both involved in protein-protein interactions with membrane associated proteins like lamellopodin, zyxin and vinculin (EVH1) and the barbed end of actin filaments (EVH2). Interference of the EVH1-protein interaction with an inhibitor could have a modulating effect on the microfilament synthesis and a positive effect on invasiv tumor cells. We have successfully developed several peptidomimetics especially for the inhibition of the EVH1 domain of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), which could also be used against the other members of the Ena/VASP family. Our best ligands showed a high affinity with a dissociation constant in the high nanomolar range. We were also able to reduce the molecular weight of our ligands to 750 Dalton and still get the same affinity as best binding peptides known for the EVH1 domain of the Ena/VASP family.



# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b>	<b>15</b>
<b>II. Materialien und Instrumente</b>	<b>27</b>
1. Scaffoldsynthese	29
2. Peptidsynthese und Peptidstammlösungen	29
3. Spotarrays	30
4. Proteinexpression und -lagerung	30
5. Verwendete Geräte und Versuchdurchführung	31
5.1. Fluoreszenzspektrometer . . . . .	32
5.2. Isotherme Titrationskalometrie . . . . .	33
5.3. NMR-Titration . . . . .	33
5.4. CD-Schmelzkurven . . . . .	33
5.5. Differentialkalorimetrie (DSC) . . . . .	34
6. Verwendete Programme	34
<b>III. Theorie</b>	<b>35</b>
7. Die thermodynamischen Parameter	37
8. Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes	47
8.1. Stöchiometrie gleich eins . . . . .	47
8.2. Stöchiometrie ungleich eins . . . . .	48

<b>9. Fluoreszenzbasierte Titrationsmethoden</b>	<b>49</b>
9.1. Fluoreszenztitration . . . . .	50
9.2. Kontinuierliche Variation . . . . .	52
9.2.1. CVM für die Stöchiometrie gleich eins – die explizite CVM . . . . .	53
9.2.2. Gleichzeitige Bestimmung der Dissoziationskonstante und des stöchiometrischen Koeffizienten – die implizite CVM . . . . .	54
9.2.3. Normierung der CVM-Fluoreszenzintensität . . . . .	55
9.2.4. Adsorption von Protein . . . . .	55
9.3. Fluoreszenzlöschung . . . . .	56
9.4. Filtereffekte . . . . .	58
<b>10. Isotherme Titrationskalorimetrie</b>	<b>61</b>
10.1. Die Lösung des Verdünnungsproblem nach MicroCal . . . . .	62
10.2. Verdünnungswärme . . . . .	63
10.3. Normierung der Einzelwärmern . . . . .	64
10.4. Bestimmung von $\Delta G^\circ$ und $-T \Delta S$ . . . . .	65
10.5. Ermittlung der Umwandlungsgeschwindigkeit des Liganden einer nichtbindenden zu einer bindenden Konformation mittels ITC . . . . .	65
<b>11. Statistik</b>	<b>69</b>
11.1. Regressionen . . . . .	69
11.1.1. OLS vs. ODR . . . . .	70
11.1.2. Gewichtete vs. ungewichtete Regression OLS . . . . .	72
11.1.3. Ausreißer . . . . .	72
11.1.4. ITC-Regression . . . . .	73
11.2. Bestimmung der Messunsicherheiten und der Konfidenzintervalle . . . . .	73
11.2.1. Berechnung der Messunsicherheiten abgeleiteter Größen über das Fehlerfortpflanzungsgesetz . . . . .	74
11.2.2. Bestimmung der Konfidenzintervalle unter Annahme der Normalverteilung von $\Delta G^\circ$ . . . . .	76
11.2.3. Bestimmung der Konfidenzintervalle über die R-Funktion <code>confint</code> . . . . .	76
11.2.4. Bestimmung der Messunsicherheit und Konfidenzintervalle über das Bootstrap-Verfahren . . . . .	77
11.2.5. Bestimmung der Konfidenzintervalle für $\Delta \Delta G$ . . . . .	78
11.3. Güte des Fits . . . . .	80
11.3.1. Das Maß $R^2$ . . . . .	80
11.3.2. Das Maß $R_{\text{linear}}^2$ . . . . .	80

11.3.3. Die Maße $Q$ und $P$ . . . . .	81
11.3.4. Verwendung der vier Maße . . . . .	83
11.3.5. Hypothesentest zur Prüfung der einzelnen Koeffizienten im Modell . . . . .	83
<b>IV. Ergebnisse</b>	<b>85</b>
<b>12. Einleitung zum Ergebnisteil</b>	<b>87</b>
12.1. Fließdiagramme der Auswerteskripte . . . . .	88
12.1.1. FT . . . . .	88
12.1.2. CVM . . . . .	90
12.1.3. ITC . . . . .	94
<b>13. Ersetzung der Proline</b>	<b>97</b>
13.1. Bindungsdaten für die Ersetzungen mit X . . . . .	97
13.1.1. Bindungsdaten CVM . . . . .	97
13.1.2. Bindungsdaten ITC . . . . .	100
13.1.3. Vergleich der Bindungsdaten für CVM und ITC . . . . .	104
13.1.4. Einfluss der Messunsicherheiten für $P_t^\circ$ und $L_t^\circ$ auf den Unterschied in $\Delta\Delta G$ . . . . .	104
13.2. HSQC-Spektren für den Protein–Liogand Komplex aus VASP-EVH1 und dem ActA-Peptid und den X-Baustein enthaltenen Chimären . . . . .	107
13.3. Der Spir2-Baustein zur Ersetzung der ersten beiden Proline des ActA- Peptids . . . . .	107
<b>14. Ersetzungen des Phenylalanins</b>	<b>113</b>
14.1. Spotarrays zur Ersetzung des bindungsrelevanten Phenylalanins . . . . .	113
14.2. Ohne Ersetzungen der Proline mit X . . . . .	114
14.3. Mit Ersetzungen der Proline mit X . . . . .	120
<b>15. Flankierende Epitope</b>	<b>127</b>
15.1. Behandlung des N-terminalen Epitops . . . . .	127
15.1.1. Verkürzungen des N-terminalen Epitops . . . . .	127
15.1.2. Ersetzungen für das N-terminale Epitops . . . . .	128
15.2. Behandlung des C-terminalen Epitops . . . . .	129
15.2.1. Einfluss der Ladung am C-terminalen Leucin . . . . .	129
15.2.2. Ersetzungen für das C-terminale Epitop . . . . .	129
15.3. Kombination N- und C-terminalen Ersetzungen . . . . .	131

<b>V. Diskussion</b>	<b>135</b>
<b>16. Einleitung zur Diskussion</b>	<b>137</b>
<b>17. Ersetzung der Proline</b>	<b>139</b>
17.1. Der X-Baustein . . . . .	139
17.2. Der Spir2-Baustein . . . . .	144
17.3. Andere Ersetzungs- und Verbesserungsmöglichkeiten für die Diprolinbausteine . . . . .	145
<b>18. Ersetzung des Phenylalanins</b>	<b>147</b>
18.1. Unnatürliche Aminosäuren erhöhen die Affinität . . . . .	147
18.2. Weitere mögliche interessante Ersetzungen des bindungsrelevanten Phenylalanins . . . . .	150
18.3. Cis/Trans-Isomerie . . . . .	153
18.4. Kombination der besten Ersetzungen für die Proline und das Phenylalanin – unsere besten Binder . . . . .	157
<b>19. Behandlung der flankierenden Epitope</b>	<b>163</b>
19.1. N-Terminale Variationen . . . . .	163
19.2. C-Terminale Variationen . . . . .	165
19.3. Beidseitige Verkürzungen . . . . .	168
<b>20. Schlussfolgerungen</b>	<b>171</b>
<b>VI. Tabellen</b>	<b>175</b>
<b>VII. Literaturverzeichnis</b>	<b>205</b>

# Tabellenverzeichnis

14.1. Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand für Enah-EVH1	121
18.1. Vergleich von $\Delta\Delta G$ für VASP-EVH1	159
20.1. Allgemeiner Aufbau der Ergebnistabellen	177
20.2. Prolinersetzungen für das VASP-EVH1-Peptid	178
20.3. $\Delta\Delta G$ für die Prolinersetzungen das ActA-Peptids	179
20.4. Monte-Carlo Simulation für die ActA-Peptid Prolinersetzungen	180
20.5. Impliziter CVM für VASP-EVH1	181
20.6. Ergebnisse für die Ersetzungen mit X und Spir2	182
20.7. $\Delta\Delta G$ für die X und Spir2 enthaltenen Peptide	183
20.8. Ersetzungen für das bindungsentscheidende Phe	184
20.9. $\Delta\Delta G$ für die Ersetzungen des bindungsentscheidenden Phenylalanins	185
20.10 Monte-Carlo Simulation für die Ersetzungen des bindungsentscheidenden Phenylalmins	186
20.11 Ersetzung des Bindungsentscheidenden Phenylalanins und der letzten beiden Proline mit X	187
20.12 $\Delta\Delta G$ für die Ersetzungen des bindungsentscheidenden Phenylalanins und der letzten beiden Proline mit X	188
20.13 Monte-Carlo Simulation für die Ersetzungen des bindungsentscheidenden Phenylalmins der letzten beiden Proline mit X	189
20.14 Unser bestbindender Ligand ist promisk	190
20.15 N-terminale Verkürzungen des ActA-Peptids	191
20.16 $\Delta\Delta G$ für die N-terminal verkürzten ActA-Peptide	192
20.17 Monte-Carlo Simulation für die N-terminal verkürzten ActA-Peptide	193
20.18 Ersetzung des N-terminalen flankierenden Epitops mit Dansyl.	194
20.19 $\Delta\Delta G$ für die N-terminal verkürzten ActA-Peptide	195
20.20 Ersetzung des N-terminalen flankierenden Epitops mit Dansylderivaten.	196
20.21 Der Einfluss von BS und 2Cl-Phe auf die Bindung	197

20.22	Einfluss der Acetylierung und Amidierung des ActA-Peptids auf die Bindung	198
20.23	$\Delta\Delta G$ für den Einfluss der Acetylierung und Amidierung des ActA-Peptids auf die Bindung . . . . .	199
20.24	Monte-Carlo Simulation für die N-Terminalen Verkürzungen für VASP- EVH1 . . . . .	200
20.25	Ergebnisse für die Ersetzung des gesamten C-terminalen Epitops durch eine unnatürliche Aminosäure . . . . .	201
20.26	Ergebnisse für die kleinsten Liganden . . . . .	202
20.27	$\Delta\Delta G$ für die kleinsten Liganden . . . . .	203

# Abbildungsverzeichnis

0.1. Genereller Aufbau der Ena/VASP-Proteine . . . . .	18
0.2. Generelle Funktion der Ena/VASP-Familie . . . . .	19
0.3. Struktur von Mena-EVH1 . . . . .	20
0.4. Bindung des Konsensusmotiv an EVH1 . . . . .	21
0.5. Die Bindung des Phenylalanins an EVH1 . . . . .	22
0.6. PPI vs. PPII . . . . .	23
1.1. X- und Spir-Baustein . . . . .	29
7.1. Deutung der molaren Reaktionsentropie . . . . .	43
11.1. $R^2$ versus $R^2_{\text{linear}}$ . . . . .	81
12.1. Flussdiagramm des Skriptes zur Auswertung der FT. . . . .	89
12.2. Flussdiagramm des Skriptes zur Auswertung der expliziten CVM. . . . .	92
12.3. Flussdiagramm des Skriptes zur Auswertung der impliziten CVM. . . . .	93
12.4. Flussdiagramm des Skriptes zur Auswertung der ITC. . . . .	95
13.1. Proteinadsorption beim CVM . . . . .	98
13.2. Die Regressionstypen für die ITC . . . . .	103
13.3. Die Verteilung von $\Delta G^\circ$ für die Monte-Carlo Simulation . . . . .	105
13.4. Chemische Verschiebung für VASP-EVH1 mit dem ActA-Peptid . . . . .	108
13.5. Chemische Verschiebung für VASP-EVH1 mit dem X-Chimären . . . . .	109
13.6. Chemische Verschiebung der NE1-HE1 Wechselwirkung der drei Trp des VASP EVH1 . . . . .	110
14.1. Erstezung der flankierenden Epitope und für das zweite Phenylalanin . . . . .	115
14.2. Stern-Volmer-Plot für VASP-EVH1 und das ActA-Peptid . . . . .	116
14.3. LC-Daten für das ActA-Peptid und seine Derivate. . . . .	117
14.4. Thermogramm für VASP-EVH1 und das Trp-ActA-Peptid . . . . .	118
14.5. Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit aus dem Thermogramm für VASP-EVH1 und das Trp-ActA-Peptid . . . . .	119

14.6. Der Einfluss des <i>M</i> -Faktors . . . . .	122
14.7. CD- und DSC-Schmelzkurven . . . . .	125
17.1. Modell der Bindung des XPP-Liganden . . . . .	141
17.2. Modell der Bindung des PXP-Liganden . . . . .	142
17.3. Modell der Bindung des PPX-Liganden . . . . .	143
17.4. Modell der Bindung des XX-Liganden . . . . .	144
17.5. Modell der Bindung des (Spir2)X-Liganden . . . . .	145
17.6. Mögliche Änderungen des vierten Prolins des ActA-Peptids . . . . .	146
18.1. Ersetzungen für das Phenylalanin des ActA-Peptids . . . . .	149
18.2. Bindung von 2Cl-Phe und 2Met-Phe . . . . .	151
18.3. Mögliche weitere Ersetzungen des bindungsrelevanten Phe . . . . .	152
18.4. Einfluss der cis/trans Isomerie des Trp-Pro . . . . .	153
18.5. Fixierung des trans-Trp . . . . .	156
19.1. Der Einfluss des freien N-Terminus des verkürzten ActA-Peptids auf die Bindung . . . . .	164
19.2. Negativ geladener N-Terminus für einen besser bindenden Liganden für EVH1-Domänen . . . . .	166
19.3. Mögliche Verbesserung des C-terminal verkürzten ActA-Peptids . . . . .	169
20.1. Flussdiagramm zur Entwicklung von Liganden zur Inhibition von Protein- Protein-Interaktionen. . . . .	173

# Abkürzungsverzeichnis

<b>PPI</b>	Polyprolinhelix I
<b>PPII</b>	Polyprolinhelix II
<b>VASP</b>	Vasodilatator-Stimuliertes Phosphoprotein
<b>Enah</b>	Enabled human Protein
<b>Mena</b>	Mammalian Enabled Protein
<b>EVL</b>	Ena-VASP-Like Protein
<b>EVH1</b>	Drosophila enabled (Ena)/Vasodilatator-Stimuliertes Phosphoprotein (VASP) Homologie 1
<b>VASP-EVH1</b>	EVH1-Domäne von VASP
<b>Enah-EVH1</b>	EVH1-Domäne von Enah
<b>Mena-EVH1</b>	EVH1-Domäne von Mena
<b>EVL-EVH1</b>	EVH1-Domäne von EVL
<b>GST</b>	Glutathion-S-Transferase
<b><math>K_D</math></b>	Dissoziationskonstante
<b><math>R</math></b>	universelle Gaskonstante
<b><math>\Delta G^\circ</math></b>	freie molare Reaktionsenthalpie pro Formelumsatz
<b><math>\Delta\Delta G</math></b>	Differenz in der freien molaren Reaktionsenthalpie pro Formelumsatz zwischen dem interessierenden Liganden und einem Referenzliganden
<b><math>\Delta H</math></b>	molare Reaktionsenthalpie pro Formelumsatz
<b><math>\Delta S</math></b>	molare Reaktionsentropie pro Formelumsatz

$-T \Delta S$	molare entropische Reaktionsenergie pro Formelumsatz
$\Delta C_p$	molare Reaktionswärmekapazität pro Formelumsatz
FT	Fluoreszenz Titration
CVM	Continuous Variation Method – Methode der kontinuierlichen Variation
ITC	Isothermal titration calorimetry – Isotherme Titrationskalometrie
2Cl-Phe	2-Chloro-L-Phenylalanin
1-Nal	L-1-Napthylalanin
2-Nal	L-2-Napthylalanin
L-Cha	L-Cyclohexylalanin
D-Cha	D-Cyclohexylalanin
Bpa	L-4-Benzoylphenylalanin
1-NS	1-Naphtylsulfonyl
2-NS	2-Naphtylsulfonyl
BS	Benzylsulfonyl
OLS	<i>ordinary least square</i> – Methode der kleinsten Quadrate
ODR	Orthogonale Distanzregression

Teil I.

# Einleitung



**Die Ena/VASP-Familie** Die zur Ena/VASP-Familie gehörenden und im Menschen auftretenden drei Proteine Vasodilatator-Stimuliertes Phosphoprotein (VASP) [97, 98], Enabled human Protein (Enah<sup>1</sup>) [44] und Ena-VASP-like Protein (EVL) [44], spielen eine entscheidene Rolle bei der Bewegung und Formänderung verschiedener Zelltypen [17, 113, 42, 30]. So regeln diese Proteine direkt das Actinfilament-Netzwerk [16], modulieren die Morphologie und das Verhalten von Pseudopodien, wie Filopodien und Lamellipodien [97, 44, 74, 73], und beeinflussen die Zellbeweglichkeit [18], aber auch die Zell-Zell-Kontakte [113, 42]. Die Mitglieder dieser Familie konzentrieren sich in den fokalen Adhäsionen und haben dort eine Schlüsselrolle bei der Veränderung des Aktin-Zytoskeletts bei der Zellantwort auf Migrationsreize [18, 120]. Aufgrund dessen ist die Ena/VASP-Familie ein einflussreicher Faktor für invasive Tumorzellen [92, 57, 50, 112], und es besteht die Hoffnung, durch geeignete Inhibitoren gegen die Ena/VASP-Familie, diesen invasiven Tumorzellen wenigstens einen Teil ihrer Gefährlichkeit zu nehmen [66].

**Genereller Aufbau und Funktion der Mitglieder der Ena/VASP-Familie** Die Mitglieder der Ena/VASP-Familie zeigen eine Reihe an strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten. So befindet sich N-terminal eine etwa 110 Aminosäuren lange Drosophila enabled (Ena)/Vasodilatator-Stimuliertes Phosphoprotein (VASP) Homologie 1 (EVH1) Domäne, mittig liegt eine prolinreiche Region, und C-terminal eine Ena/VASP Homologie 2 (EVH2) Domäne, wobei die letzteren beiden Abschnitte eine variable Länge für die jeweiligen Familienmitglieder besitzen [100] (siehe auch Abb. 0.1).

Die EVH1-Domäne stellt eine Protein-Protein-Erkennungsdomäne dar, deren Bindungspartner unter anderem Lamellipodin [30], Vinculin und Zyxin [99] sind. Die zentrale prolinreiche Region der Proteine bindet nicht die EVH1-Domäne, sondern sie vermittelt Interaktionen zu anderen prolinreichen Sequenzen erkennenden Proteinen, wie Profilin [96, 44], SH3-Domänen – wie z. B. die der Abl-Tyrosin-Kinase [73] –, und die WW-Domäne von FE65 [35]. Die EVH2-Domäne multimerisiert je vier Proteine eines Mitglieds der Ena/VASP-Familie über eine coiled-coil zu einem Homotetramer und kann mit monomerem G- und filamentösen F-Aktin interagieren [6, 14]. Dabei wirken die Ena/VASP-Proteine dann als ein Anticapping, d. h. sie verhindern die Anlagerung von Capping Proteinen, die eine Verlängerung des Actinfilaments inhibieren [16].

Die Proteine der Ena/VASP-Familie besitzen eine konservierte Phosphorylierungsstelle für die Protein Kinase A (PKA) und C (PKC) [24, 30, 51], die die Aktivität der Proteine regulieren [56, 30, 67]. Enah/Mena und VASP haben zusätzlich eine zweite Phosphorylierungsstelle, die ein Substrat für die Protein Kinase G (PKG) ist [24, 56, 51, 30].

---

<sup>1</sup> auch bekannt als Mammalian enabled (Mena) Protein

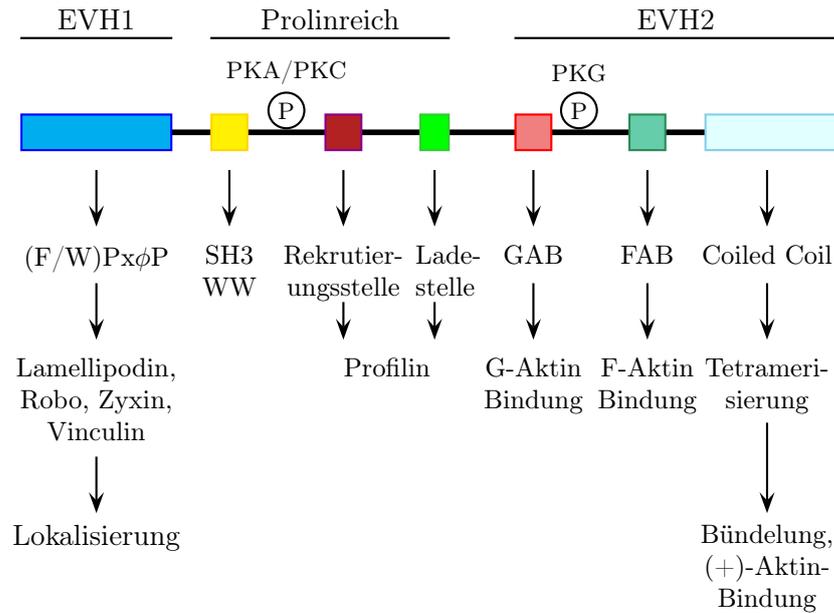


Abbildung 0.1.: Genereller Aufbau der Ena/VASP-Proteine nach Dress et al. [30] und Ferron et al. [38].

Die EVH1- und die coiled-coil-Domänen der Ena/VASP-Familie haben stabil gefaltete Strukturen [36, 93, 9, 71]. Der prolinreiche Bereich dagegen wird als größtenteils ungeordnet angesehen, er kann aber in drei Teilbereiche eingeteilt werden: Einer regulatorischen Bindungsstelle, an die SH3- und WW-Domänen binden können, einer Rekrutierungsstelle für Profilin und einem sogenannten Ladungsbereich, ebenfalls für Profilin [38, 16].

Die Mitglieder der Ena/VASP-Familie binden also mittels der EVH2-Domäne an F-Aktin und mittels der EVH1-Domäne an Proteine, die selbst wieder an Membranproteine binden, wodurch es zu einer lokalen Verknüpfung des (+)-Endes eines Aktin-Filamentes mit der Membran des Ahäsionspunktes kommt (siehe Abb. 0.2). Durch die Bindung von, mit monomeren Aktin beladenen, Profilin an die prolinreiche Sequenz wird die lokale Konzentration von Aktinmonomeren um das (+)-Ende des F-Aktin erhöht und so die Verlängerung des Filamentes beschleunigt [105]. Der Gedanke ist nun, die Verbindung der EVH1-Domäne mit ihrem Bindungspartner zu unterbrechen, wodurch das F-Aktin-Filament die Verknüpfung zum Ahäsionspunkt verliert. So zeigte Kang et al., dass in Myofibroblastären Tumovorläuferzellen, in denen EVH2 überexprimiert wurde, sich das Tumorwachstum verringerte [66].

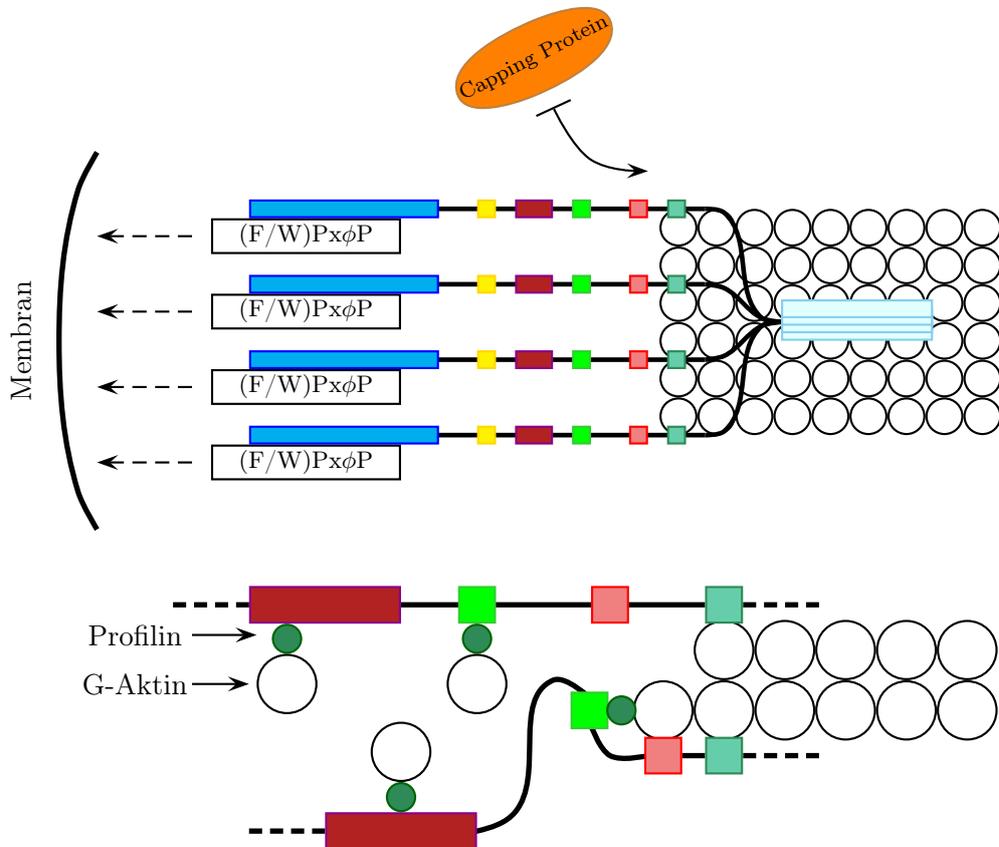


Abbildung 0.2.: Generelle Funktion der Ena/VASP-Familie nach Bear et al. [16] und Fer-  
 ron et al. [38]. Je vier Proteine eines Mitglieds der Ena/VASP-Familie  
 werden über die EVH2-Domäne tetramerisiert und dieses Tetramer bin-  
 det dann ebenfalls über die EVH2-Domäne an das (+)-Ende eines Aktin-  
 filamentes. Das verhindert auch gleichzeitig die Anlagerung von Cap-  
 ping Protein, welches die Verlängerung des Aktinfilamentes unterbindet.  
 Die EVH1-Domäne erkennt ihre Bindungspartner über ein (F/W)PxφP-  
 Konsensusmotiv, wobei diese Bindungspartner selbst wieder an Mem-  
 branproteine binden, wie bpsw. Integrine. Über die prolinreiche Region  
 des Ena/VASP-Proteins wird mit monomeren G-Aktin beladenes Profi-  
 lin am (+)-Ende des Aktinfilaments angereichert, wobei die Ena/VASP-  
 Proteine die Assoziation des monomeren G-Aktins an das filamentöse  
 F-Aktin unterstützen.

**Die Bindung der EVH1-Domäne an ihren Bindungspartner** Die EVH1-Domäne der Ena/VASP-Familie erkennt ihre Bindungspartner über eine von ihnen exponierte Peptidsequenz, die das Konsensusmotiv (F/W)Px $\phi$ P aufweist, wobei x fast jede beliebige und  $\phi$  eine aliphatische proteinogene Aminosäure darstellt [8, 10]. Könnten wir einen kleinen Liganden so entwickeln, dass er besser als die exponierten Peptidsequenzen an die EVH1-Domäne bindet, könnten wir die Bindungspartner der Proteine der Ena/VASP-Familie von der EVH1-Domäne verdrängen und so die Verknüpfung zwischen dem Actin-Filament und dem Adhäsionspunkt stören.

Die bekannten Strukturen der Mitglieder der Ena/VASP-Familie [93, 36, 9] zeigen ein kompaktes rechtwinkliges  $\beta$ -Sandwich mit einer angeschlossenen langen  $\alpha$ -Helix, und weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zur Pleckstrin Homologie (PH) und Phosphotyrosin Bindung (PTB) Homologie auf [106] (siehe Abb. 0.3). Für die Mena- und EVL-

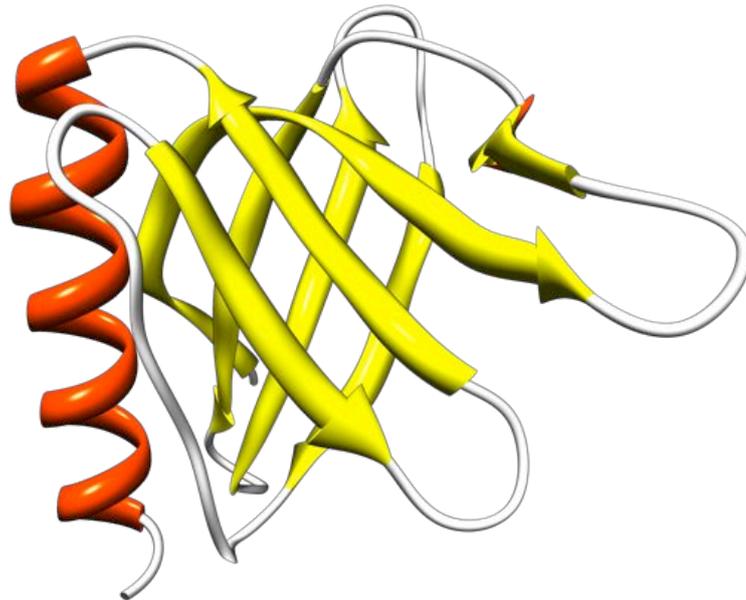


Abbildung 0.3.: Die Struktur 1evh der Mena-EVH1 [93].

EVH1 sind zusätzlich die Strukturen des Protein-Ligand-Komplexes bekannt [93, 36]. Diese zeigen, dass das Konsensusmotiv durch einen Cluster von drei hochkonservierten Aminosäureresten an der Oberfläche der Domäne erkannt werden (siehe Abb. 0.4). In der Kristallstruktur des Protein-Ligand-Komplexes aus Mena und dem Peptidliganden Ac-FPPPT-NH<sub>2</sub> sind diese Seitenkette Tyr16, Trp23 und Phe77. Für die anderen Ena/VASP-EVH1-Domänen sind diese Seitenketten die selben, allein die Nummerierung lautet anders.

## Einleitung

Die Polyprolinhelix des Peptidliganden bildet eine Polyprolin-Helix II (PPII) [10] aus, wobei die Proteinoberfläche der EVH1-Domäne so gestaltet ist, dass die PPII fast perfekt gebunden wird. Die N- und C-terminal liegenden bindungsrelevanten Proline des Peptidliganden passen in zwei hydrophobe Bindungstaschen, die durch die Seitenketten des Tyr16 und Trp23 (N-terminales Prolin) und durch Trp23 und Phe77 (C-terminales Prolin) flankiert werden. Das dritte Proline hat dabei auch Kontakt zum Phe77, wohingegen das zweite Prolin keinen direkten Kontakt zur Oberfläche des Proteins besitzt. Der Ligand wird zusätzlich durch zwei Wasserstoffbrücken stabilisiert, die durch den Carbonylsauerstoff zwischen dem ersten und dem zweiten Prolin und dem Gln79, und durch den Carbonylsauerstoff zwischen dem zweiten und dritten Prolin und dem Trp23, gebildet werden (siehe Abb. 0.4).

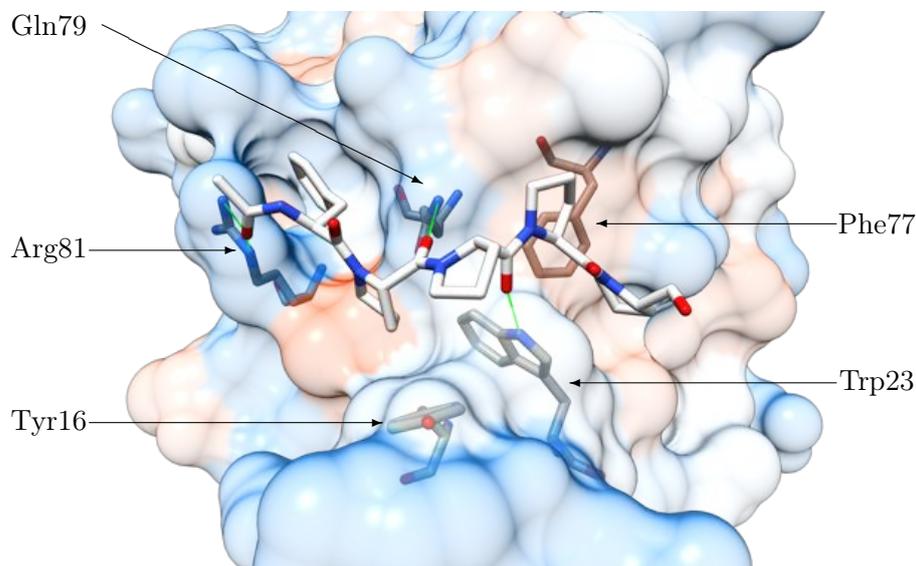


Abbildung 0.4.: Bindung des Ac-FPPPP-Kernmotivs an Mena-EVH1. Dargestellt ist die Kristallstruktur 1evh [93]. Weiß ist die Sequenz Ac-FPPPP des Liganden, grün sind die Wasserbrücken, die Proteinoberfläche ist als transparente Hydrophobizitätsmap dargestellt (ocker: stark hydrophob, blau: stark hydrophil). Das N-terminal und das C-terminale Prolin des Peptidliganden liegen in einer hydrophoben Tasche des Proteins.

Die Polyprolinsequenz allein genügt für die Bindung nicht, auch die N-terminal gelegene, aromatische Aminosäure ist bindungsentscheidend [8, 9]. Die aromatische Seitenkette des Peptidliganden wird in einer Tasche gebunden, die durch das Arg81, Gln79, Asn71, Val86 und das Lys69 gebildet wird (so auch analog in VASP- und EVL-EVH1, siehe Abb. 0.5). Aber auch der Peptidligand Ac-FPPPT-NH<sub>2</sub> allein bindet nur schwach an

die Ena/VASP-EVH1-Domänen [93, 9].

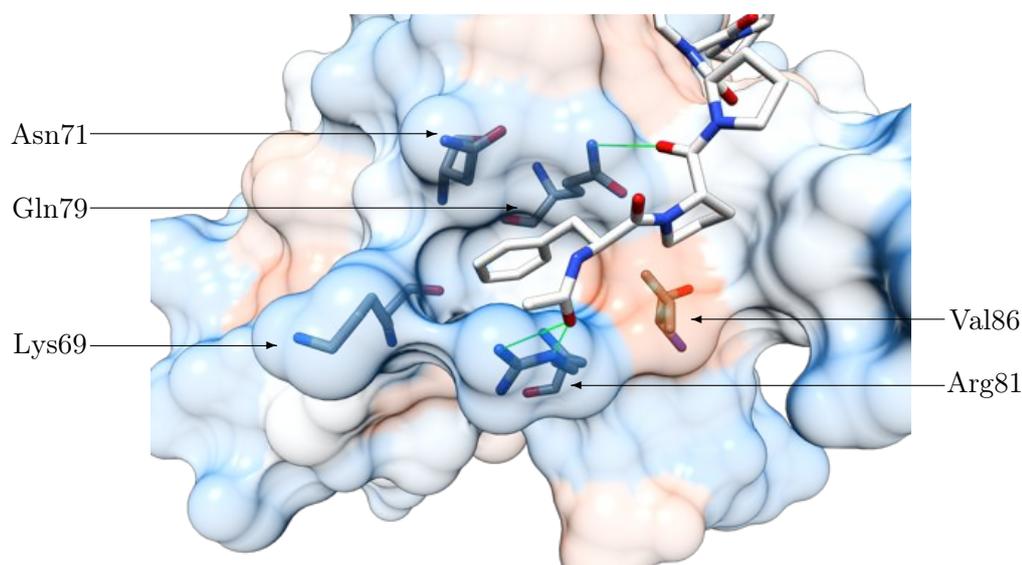


Abbildung 0.5.: Das bindungsrelevante Phenylalanin wird in einer Tasche gebunden. Dargestellt ist die Kristallstruktur 1evh [93].

**Eigenschaften von Polyprolinsequenzen** Polyprolinsequenzen haben, im Vergleich zu Sequenzen anderer Aminosäuren, eine geringere Anzahl an Freiheitsgraden, da die Cyclisierung den Torsionswinkel  $\Phi$  der Hauptkette festlegt und auch der Fünfring des Prolins weniger flexibel ist, als die Seitenkette der meisten anderen proteinogenen Aminosäuren.

Aufgrund der Peptidbindung kann der Torsionswinkel  $\Omega$  der Hauptkette nur zwei Werte annehmen:  $0^\circ$  (cis) und  $180^\circ$  (trans). Damit lassen sich zwei Extrema der Polyprolinsequenz bezeichnen: Eine all-cis und eine all-trans Polyprolinsequenz (siehe Abb. 0.6). Die all-cis Polyprolinsequenz wird auch als (rechtshändige) Polyprolinhelix I (PPI, ideale Torsionswinkel der Hauptkette  $(\Phi, \Psi, \Omega) = (-75^\circ, 160^\circ, 0^\circ)$ ) und die all-trans Polyprolinsequenz als (linkshändige) Polyprolinhelix II (PPII, ideale Torsionswinkel der Hauptkette  $(\Phi, \Psi, \Omega) = (-75^\circ, 145^\circ, 180^\circ)$ ) bezeichnet [55]. Die PPI-Helix wird in organischen Lösungsmitteln, wie 1-Propanol, bevorzugt, wohingegen die PPII-Helix in wässrigen Lösungen dominiert [65, 110]. Daher sind PPI-Helices in biologischen System selten, die PPII-Helices dagegen häufig in gefalteten Proteinen [109] und ungefalteten Polypeptiden [108] zu finden, so auch bei den Liganden der Ena/VASP-EVH1-Domänen [10].

Die PPII-Helix hat genau drei Prolin-Reste je Drehung und der Anstieg der Helix ist  $9,3 \text{ \AA}$  je Drehung, während die PPI-Helix mit  $5,6 \text{ \AA}$  je Drehung kompakter ist und für eine Drehung etwa 3,3 Proline benötigt [55] (siehe auch Abb. 0.6). Im Gegensatz zu

## Einleitung

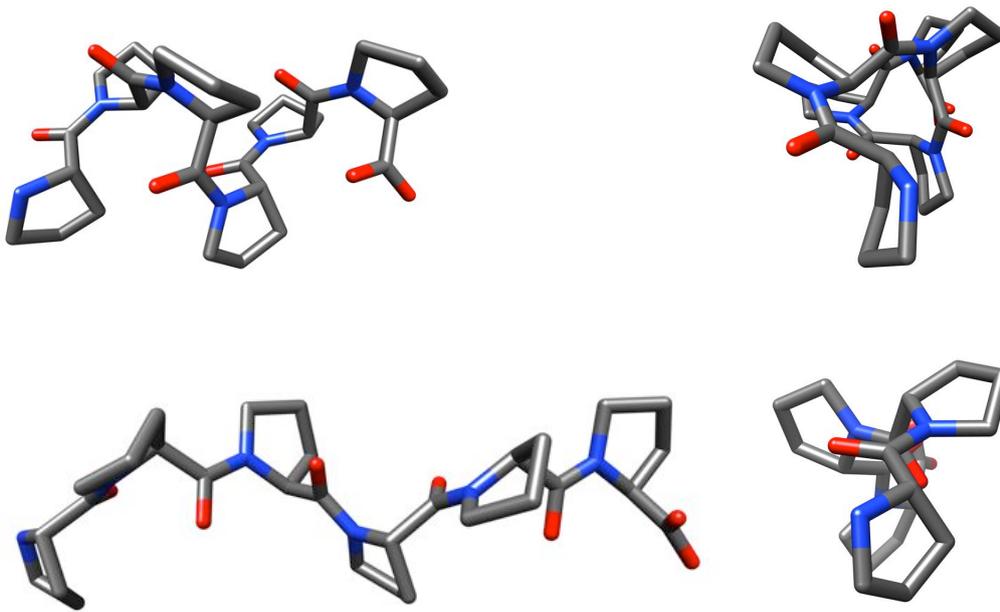


Abbildung 0.6.: Vergleich zwischen den PPI (oben) und der PPII (unten), in einer Seitenansicht (links) und einer Draufsicht (rechts). Beide Sequenzen haben die gleiche Anzahl an Resten, dabei ist die PPI ist kompakter, als die PPII.

den Sekundärstrukturen  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt zeigen Polyprolinhelices keine intramolekularen Wasserstoffbrücken der Hauptkette. In der PPII scheint jedoch die ( $n \rightarrow p^*$ )-Interaktion zwischen dem Carbonylsauerstoff  $O_{i-1}$  und dem Carbonylkohlenstoff  $C_i$  die Hauptkette der PPII zu stabilisieren [55, 53]. Anders als in der PPI-Helix zeigen in der PPII-Helix die Carbonylsauerstoffe etwa im  $90^\circ$ -Winkel von der Helix weg, und sind so für Interaktion mit Bindungspartnern leichter zugänglich. Die Carbonylsauerstoffe der Polyprolinsequenz sind zusätzlich basischer, damit elektronenreicher und bessere Wasserstoffbrückenakzeptoren als andere proteinogene Aminosäuren [114]. Die eingeschränkte Flexibilität von Polyprolinsequenzen bedeutet einen energetischen Vorteil für die Bindung solcher Sequenzen gegenüber anderen Sequenzen, die sich erst in eine bindungsaktive Konformation falten müssen [63].

Die PPII-Helix ist achsensymmetrisch (pseudo C2 Rotationssymmetrie [10]), weshalb für die Bindung zwei grundsätzliche Modi für eine PPPP-Sequenz denkbar sind: Das erste und das vierte Prolin zeigen in Richtung Oberfläche des Bindungspartners (PxxP bzw. Modus 1; die als x bezeichneten Proline zeigen Richtung Lösungsmittel), oder das zweite und dritte Prolin zeigen in Richtung Bindungspartner (xPPx bzw. Modus 2) [10]. Die Ena/VASP-EVH1-Domänen erkennen die PPII-Helix im Modus 1, was sich auch im Konsensusmotiv (F/W)Px $\phi$ P niederschlägt (vergleiche Abb. 0.4).

**Bisherige Versuche der Ligandenentwicklung** Bei der Entwicklung von Inhibitoren gegen die Ena/VASP-Familie gab es bisher drei Ansätze: (i) Abwandlung eines bereits existierenden Peptidliganden [121], (ii) Entwicklung von kleinen synthetischen Proteinen [54, 46] und (iii) von assemblierten synthetischen Peptiden [60].

Im ersteren Fall wurden von Zimmermann et al. die bindungsrelevanten Proline durch Sarkosin ersetzt (entweder beide oder nur das N-terminale) und dessen sekundäres Amin wurde mit einer, ein primäres Amin enthaltenden, Komponente umgesetzt [121]. Die sich daraus ergebenden N-substituierten Peptide wiesen jedoch alle eine geringere Affinität als das verwendete Ausgangspeptid auf.

Im zweiten Fall wurden von Golemi-Kotra et al. [46] bzw. Holtzman et al. [54] zwei synthetische Miniproteine erzeugt, pGolemi bzw. pGol-2, wobei pGolemi mit ca. 700 nM an Mena-EVH1 band. Diese Proteine haben allerdings ein Molekulargewicht von ca. 3,5 kDa und sind daher als Wirkstoffe nicht nur zu groß, sondern auch ihrer peptidschen Natur wegen als Wirkstoff ungeeignet.

Im dritten Fall wurden durch Hunke et al. assemblierte Peptide, bestehend aus einem linearen und einem cyclischen Anteil, für Mena-EVH1 untersucht, wobei sie auch Liganden fanden, die im einstelligen mikromolaren Bereich an Mena-EVH1 banden [60]. Diese

Inhibitoren besaßen jedoch mit 26 Resten und ihrer peptidischen Struktur wie pGolemi und pGol-2 eine ungünstig hohes Molekulargewicht und weiterhin eine peptidische Natur.

**Ersetzungen von Prolinen und PPII-Mimetika** Bei der Entwicklung von Peptidomimetika für die Ena/VASP-EVH1-Domänen stellt die Ersetzung der PPII-Helix im Allgemeinen ein Problem dar, da der Bindungsmodus des Protein-Ligand-Komplexes sehr stark an dieses Strukturmerkmal angepasst ist. Es gibt eine Reihe an Versuchen zur Erzeugung von PPII-Mimetika bzw. Ersetzungen von Prolinen in PPII-Helices, jedoch mit gemischtem Erfolg und – bis auf die Arbeit von Zimmermann et al. [121] – hauptsächlich mit SH3-Domänen als Target: So war zwar Ngyen et al. erfolgreich [84], die meisten anderen bekannten Versuche lieferten jedoch Liganden, die mit geringerer Affinität als ihre Ausgangspeptide banden [103, 121, 117, 83, 26]. Dabei scheint es häufig so zu sein, dass die PPII-Mimetika zwar die Konformation der PPII aufweisen, die gemachten Änderungen jedoch zu einer Störung der Bindung führten.

Wir haben für diese Arbeit zwei Diprolin-PPII-Mimetika – den Baustein X [119, 118, 61] und Spir2 [101] – zur Verfügung, die exklusiv als PPII-Mimetika für die Ena/VASP-EVH1-Domänen konzipiert wurden (siehe Abb. 1.1), auch wenn sie – mit geringer Verschlechterung der Affinität – bei Fyn-SH3 eingesetzt werden konnten [119]<sup>2</sup>. Bei beiden PPII-Mimetika wurden zwei Proline über eine Vinylbrücke verknüpft, wobei für den X-Baustein die Vinylbrücke den dritten Kohlenstoff des C-terminalen Prolins mit dem ersten Kohlenstoff des N-terminalen Prolins verbindet, und für den Spir2-Baustein den dritten Kohlenstoff des C-terminalen Prolins mit dem C<sub>α</sub>-Kohlenstoff des N-terminalen Prolins verbrückt. Beide Bausteine sind dabei enantiomerenrein und haben die Konfiguration der PPII.

### **Ziel der Arbeit: Ligandenentwicklung zur Inhibition der Ena/VASP-EVH1-Domänen**

Peptide und Proteine können zwar sehr hochaffine Inhibitoren von Protein-Protein-Interaktionen darstellen, wegen ihres peptidischen Charakters sind sie allerdings als Wirkstoffe denkbar ungeeignet: Sie können durch den Stoffwechsel schnell inaktiviert werden und sind schlecht bioverfügbar [69]. Daher suchen wir organische Moleküle, die einerseits zur kompetitiven Inhibition der Protein-Protein-Interaktionen fähig sind und zum anderen ihren peptidischen Charakter weitestgehend verloren haben und eine bessere Bioverfügbarkeit besitzen.

---

<sup>2</sup>Zusätzlich zeigte sich in der Arbeit von Zaminer et al. [119], dass die von Li et al. als erfolgreich bewertete Entwicklung eines nanomolar bindenden selektiven Liganden für Fyn-SH3 [75] nicht reproduziert werden konnte und der entsprechende Ligand nur im einstelligen mikromolaren Bereich band.

Für diesen Zweck verwenden wir das struktur- und ligandbasierte rationale Design von Peptidomimetika, wie es in Klebes Buch *Wirkstoffdesign* beschrieben wurde [69]. Wir gehen also von einem bereits bekannten Peptidliganden aus, der über verschiedene Schritte sukzessiv abgewandelt wird. Dazu verwenden wir die gut untersuchte Peptidsequenz SFEFPPPTEDEL aus dem Protein ActA des pathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes* [49, 78, 85, 8, 9]. Mit dem Konsensusmotiv (F/W)Px $\phi$ P wurden bereits die relevanten Aminosäuren in diesem Peptid bestimmt [8, 9], außerdem wurde erkannt, dass das Kernmotiv FPPPP des ActA-Peptids für die Bindung allein nicht ausreichend ist, sondern dass die das Kernmotiv flankierenden Sequenzen SFE und TEDEL auf die Affinität der Bindung einen modulierenden Einfluss haben [9].

Für die Ligandenentwicklung ist die Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  bzw. freien Enthalpie  $\Delta G^\circ$  zentral, da es sich hierbei eine Optimierungsaufgabe handelt: Finde einen Inhibitor so, dass dessen  $K_D$  (bzw.  $\Delta G^\circ$ ) und sein Molekulargewicht gegen null (bzw. minus unendlich) läuft, oder wenigstens eine zu setzende Marke unterschreitet. Für die Lösung der Optimierungsaufgabe wollen wir den chemischen Raum um einen zu setzenden Startpunkt – der in diesem Falle das ActA-Peptid ist – auf die freie Enthalpie hin untersuchen, wobei uns hier prinzipiell nur die Änderung in der freien Enthalpie  $\Delta\Delta G$  gegenüber dem Startpunkt interessiert. Analog zu den Lösungen von nichtlinearen Regressionsproblemen ist  $\Delta\Delta G$  der Gradient der freien Enthalpie des chemischen Raumes um den Startpunkt herum, den wir verwenden, um uns das globale Minimum an freier Enthalpie heranzutasten.

Als ersten Schritt wandeln wir dazu die Seitenketten der relevanten Aminosäuren des ActA-Peptids ab, wobei wir mit den zur Verfügung stehenden PPII-Mimetika X und Spir2 zusätzlich eine Versteifung der Konformation vornehmen. Dabei sollen auch die beiden PPII-Mimetika validiert werden. Wir wollen dann die flankierenden Sequenzen abwandeln bzw. auch verkürzen, um so weitere Affinitätsgewinne zu erzielen, aber auch um das Molekulargewicht zu verringern.

Teil II.

## Materialien und Instrumente



## 1. Scaffoldsynthese

Die in dieser Arbeit verwendeten (Fmoc-geschützten) Diprolinbausteine X und Spir2 (siehe Abb. 1.1) wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. H.-G. Schmalz an der Organischen Chemie der Universität zu Köln von Jan Zaminer, Peter Huy und Cédric Reuter synthetisiert [119, 118, 61, 101].

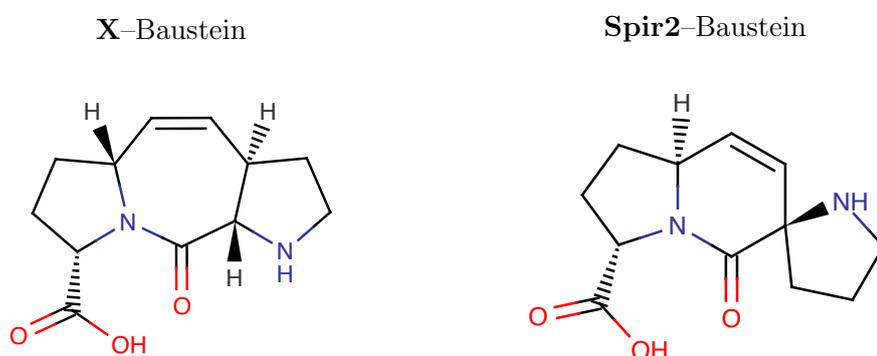


Abbildung 1.1.: Die verwendeten Diprolinbausteine. Für die Peptidsynthese war das sekundäre Amin Fmoc-geschützt.

## 2. Peptidsynthese und Peptidstammlösungen

Die Peptide wurden nach dem Standard  $N^{\alpha}$ -9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) Festphasen-Protokoll mit einem ABI 433A Automaten (Applied Biosystems) im Batchwise Mode synthetisiert [19]. Die für die Synthese benötigten Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden – sofern es sich nicht um die beiden Diprolinbausteine handelte – über IRIS Biotech bezogen.

Die Peptide wurden mittels präparativer Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie an einem LC-10AD System (Shimadzu) gereinigt, wobei bei 220 nm detektiert wurde. Die Reinheit der Endprodukte wurde mittels analytischer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bestimmt und war  $> 95\%$ . Die erwarteten molaren Massen der Peptide wurden mittels des Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation Flugzeitmassenspektrometer Voyager-DE STR (Applied Biosystems) bestätigt.

Die Synthese, Aufreinigung und Massenbestimmung der Peptide wurde im Arbeitskreis von Dr. Michael Beyermann am FMP Berlin durchgeführt.

Für die Stammlösungen wurden die Peptide mit der Mikrofeinwaage AT21 Comparator (Mettler Toledo) in Protein LoBind Reaktionsgefäße (Eppendorf) eingewogen. Der pH der Lösungen wurde mittels der Mikro-pH-Elektrode InLab®Micro (Mettler Toledo) bestimmt, und wenn notwendig wurde der pH-Wert mit von den Puffern abgeleiteten basischen oder sauren Lösung eingestellt. Die Peptide wurden dann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder  $-25^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3. Spotarrays

Die an Whatman-50-Zellulose gebundenen Peptide wurden mittels einer automatisierten Spotsynthese synthetisiert [52], wobei die Synthese und Qualitätskontrolle der Spotmembranen im Arbeitskreis von Dr. Michael Beyermann am FMP Berlin durchgeführt wurde.

Die Membran mit den Peptiden wurde mit Ethanol und Phosphatpuffer (40 mM Natrium-Phosphat, pH 7,3, 100 mM NaCl, 1 mM DTT) gewaschen und mit Milchpuffer in Phosphatpuffer geblockt. Nach Waschen mit Phosphatpuffer wurde  $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$  GST-VASP-EVH1 Fusionsprotein in Milchpuffer in Phosphatpuffer über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach Waschen mit Phosphatpuffer wurde mit einem Meerrettichperoxidase konjugierten Anti-GST-Antikörper (GE Healthcare) inkubiert und danach wurde die Membran wieder mit Phosphatpuffer gewaschen. Die Bindung wurde nach Zugabe des chemilumineszenten Substrats Peroxid/Luminol (Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent) mit einem LumiImager™ (Boehringer Ingelheim) detektiert.

## 4. Proteinexpression und -lagerung

VASP-, EVL- und Enah-EVH1 wurden als Glutathion S-Transferase (GST) Fusionsprotein in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und nach Sonifizierung mittels einer Glutathion Sepharose 4B Säule (GE Healthcare) aufgereinigt. Der GST-Tag wurde mit Thrombin (GE Healthcare) abgespalten und das Gemisch mittels Gelfiltration an einer Superdex 75 Säule (GE Healthcare) aufgereinigt [9].

Alle  $^{15}\text{N}$ -markierten Proteine wurden in *E. coli* BL21(DE3) in Minimalmedium mit  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  wie oben beschrieben exprimiert und aufgereinigt [9, 40].

Die Proben wurden dann mit Amicon Centriplus-10 concentrators (Millipore, Billerica, USA) aufkonzentriert [9]. Gegebenfalls wurden die Proteine aliquotiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Zum schnellen Auftauen wurden die Aliquots in einem Thermoschüttler bei  $25^\circ\text{C}$  geschüttelt und danach für 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 16100 rcf zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Die Konzentration wurde mittels UV-Adsorption bei 280 nm bestimmt, wobei wir die Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_{\text{VASP-EVH1}} = 20970 (\text{M} \times \text{cm})^{-1}$ ,  $\varepsilon_{\text{Enah-EVH1}} = 16960 (\text{M} \times \text{cm})^{-1}$  und  $\varepsilon_{\text{EVL-EVH1}} = 18450 (\text{M} \times \text{cm})^{-1}$  verwendeten.

## 5. Verwendete Geräte und Versuchsdurchführung

Alle Experimente wurden in Phosphatpuffer (40 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,3, 100 mM NaCl, 1 mM DTT) und bei  $25^\circ\text{C}$  durchgeführt, soweit nicht anders angegeben.

## 5.1. Fluoreszenzspektrometer

Zum Einsatz kamen das FP-6500 (Jasco) für die FT und die CVM, und das Cary Eclipse (Varian) nur für die CVM. Für die FT wurde eine  $3 \times 10$  mm Halbmikroküvette mit Rührfeld aus dem Quarzglas Suprasil (Hellma) mit Magnetrührer verwendet, und für die CVM eine  $3 \times 3$  mm Ultramikroküvette aus Quarzglas Suprasil (Hellma).

Für das FP-6500 verwendeten wir eine Anregungswellenlänge von 298 nm, Spaltbreite 1 nm (FT) bzw. 3 nm (CVM) und Emissionswellenlänge von 340 nm, Spaltbreite 3 nm. Für die Titration der Trp-haltigen Liganden setzten wir die Anregungswellenlänge auf 300 nm. Für jeden Messpunkt wurde 0,5 sec (FT) bzw. 4 sec (CVM) die Intensität gemessen und gemittelt.

Für das Cary Eclipse verwendeten wir eine Anregungswellenlänge von 298 nm, Spaltbreite 5 nm, und eine Emissionswellenlänge von 340 nm Spaltbreite 5 nm. Für jeden Messpunkt wurde 4 sec (CVM) die Intensität gemessen und gemittelt.

Zur Pipettierung und Bereitung der Protein- und Ligandlösung und zur Injektion der Ligandlösung wurde Plastikmaterial mit geringer Adsorptionsfähigkeit verwendet (Eppendorf, Biozym, G.Kisker).

Die Auswertung der Daten wird im Abschnitt *Theorie* dieser Arbeit beschrieben, wobei die Auswertung selbst mittels R [95] oder modernen Fortran und dem Paket ODRPack [21] durchgeführt wurde.

**Durchführung FT** Es wurden 800  $\mu$ L einer 5 bis 10  $\mu$ M Proteinlösung in die Halbmikroküvette vorgelegt und für 5 min temperiert. Für die Titration wurden 5  $\mu$ L Ligandlösung mit einer variablen 10  $\mu$ L-Pipette (Eppendorf) in die Küvette injiziert, dabei wurde die Pipettenspitze für die gesamte Titration nicht gewechselt. Zwischen zwei Injektionen wurde ca. eine Minute gewartet. Insgesamt wurden 20 Injektionen durchgeführt (entsprechend 100  $\mu$ L an injiziertem Ligandvolumen). Die Lösung in der Küvette wurde gleichmässige gerührt und es wurde darauf geachtet, dass das gesamte Volumen der Lösung in der Küvette stets homogen durchmischt war.

**Durchführung CVM** Der Volumenanteil  $\phi_L$  (9.11) der Ligandlösung wurde in 0,1-Schritten von 0 bis 1 variiert, wobei das Gesamtvolumen aus Protein- und Ligandlösung konstant bei 70  $\mu$ L lag. Die Lösungen der einzelnen Messpunkte wurden vorgelegt. Die maximale Konzentration des Proteins war 10  $\mu$ M und die maximale Konzentration des Liganden wurde so variiert, dass das Maximum des CVM-Plots den Wert  $\phi_L = 0,2$  nicht unterschritt. Die Ligandlösung wurde in der  $3 \times 3$  mm Küvette für 5 min temperiert und dann vermessen.

## 5.2. Isotherme Titrationskalometrie

Zum Einsatz kam die VP-ITC und ITC200 (MicroCal, GE). Die Proteinkonzentration in der ITC-Zelle war 20  $\mu\text{M}$  (VP-ITC) bzw. 100  $\mu\text{M}$  (ITC200) und die Ligandkonzentration in der Injektionsspritze wurde so gewählt, dass eine sinnvolle Titrationskurve entstand. Es wurde darauf geachtet, dass kein pH-Diskrepanz grösser als 0,05 pH-Einheiten auftrat. Die Anwesenheit von 1 mM DTT im Puffer hatte generell keinen Einfluss auf die Messungen, da das DTT nie frisch zu gesetzt wurde.

Die Injektionsvolumina waren 10  $\mu\text{L}$  (VP-ITC) bzw. 3,8  $\mu\text{L}$  (ITC200), wobei die erste Injektion ein Volumen von 5  $\mu\text{L}$  (VP-ITC) bzw. 1  $\mu\text{L}$  (ITC200) hatte. Die Anzahl an Injektionen waren 28 (VP-ITC) und 11 (ITC200), die Referenzpower 18  $\mu\text{cal}/\text{sec}$  (VP-ITC) bzw. 11  $\mu\text{cal}/\text{sec}$  (ITC200), die Rührgeschwindigkeit war 307  $\text{sec}^{-1}$  (VP-ITC) bzw. 1000  $\text{sec}^{-1}$  (ITC200). Die *Filter Period* war für beide Geräte 2 sec.

Zur Auswertung wurde das `Origin`-basierte Programm von MicroCal [82] und die Skriptsprache R [95] verwendet, wobei die Auswertung selbst im Abschnitt *Theorie* dieser Arbeit beschrieben wird. Die integrierten Wärmen je Injektion wurden für die Datenauswertung von Kalorie in Joule umgerechnet (Internationale Tafelkalorie: 1 cal  $\equiv$  4,1868 J).

## 5.3. NMR-Titration

Die  $^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektren wurden mit einem DRX600 Spektrometer (Bruker) in der Standardkonfiguration mit einem Triple-Resonanz-Probenkopf mit Drei-Achsen abgeschirmten Gradientenspulen aufgenommen. Die Konzentration des Proteins war mindestens 200  $\mu\text{M}$ , wobei die Lösung 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  enthielt. Die Peptide wurden schrittweise zugegeben und dann wieder  $^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektren aufgenommen.

Die Daten wurden mit XNMR prozessiert und mit Sparky (T. D. Goddard and D. G. Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco) ausgewertet. Die chemische Verschiebung eines Peaks  $\Delta\delta$  wurde aus den chemischen Verschiebungen der Protonen- $\Delta\delta_{\text{NH}}$  und der Stickstoffachse  $\Delta\delta_{\text{N}}$  berechnet:

$$\Delta\delta = \sqrt{\Delta\delta_{\text{NH}}^2 + \frac{\Delta\delta_{\text{N}}^2}{15}} \quad (5.1)$$

## 5.4. CD-Schmelzkurven

Es wurde das Gerät J-720 (Jasco) mit der Temperatureinheit PTC-4235/15 (Jasco) verwendet. Die Küvette (Hellma) hatte eine Schichtdicke von 1 mm.

Für die Schmelzkurven wurde bei einer Wellenlänge von 208 nm (1 nm Spalt) gemessen. Der Temperatur wurde von 4°C auf 90°C mit 60°C/h erhöht und mit einer Auflösung von 0,1°C gemessen. Es wurde für jeden Punkt über 4 sec gemessen und dann gemittelt. Die Empfindlichkeit des Gerätes war auf 100 mdeg eingestellt.

## 5.5. Differentialkalorimetrie (DSC)

Es wurde das Gerät VP-DSC (MicroCal, GE) verwendet. Die Messung fand über einen Temperaturbereich von 30°C bis 60°C statt, wobei eine Scan-Rate von 60°C/h mit einer Response-Time von 6,59 sec verwendet wurde.

# 6. Verwendete Programme

Die Modellierungen wurden mit Sybyl X (Tripos) erstellt. Die molekularen Graphiken wurden mittels des UCSF Chimera Pakets<sup>1</sup> erstellt [91]. Chimera wurde von der Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics an der University of California, San Francisco entwickelt, mit Unterstützung des National Institutes of Health, USA. Die Skripte zur Auswertung wurden in R [95] geschrieben, ausser für die implizite CVM, welches in modernem Fortran – unter Verwendung des Programmpakets ODRPack [21] – geschrieben wurde. Zur Untersuchung der Kristallstruktur eines Protein-Ligand-Komplexes auf die Existenz von Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen wurde das Programm Capture<sup>2</sup> [43] verwendet.

---

<sup>1</sup><http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>

<sup>2</sup><http://capture.caltech.edu/>

Teil III.  
Theorie



## 7. Die thermodynamischen Parameter

**Die Gleichgewichtskonstante** Allgemein gehen wir bei der Interaktion von einem Protein mit einem Liganden davon aus, dass eine einfache eins-zu-eins Reaktion vorliegt. Aus Gründen der Allgemeinheit wird dies aber meist so formuliert, dass das Protein P  $n$  identische und unabhängige Bindungsstellen für den Ligand L besäße [63]:



Wichtig an der Reaktion ist, dass es dabei zu keiner Umsetzung der Edukte kommt. Daher ist die totale Konzentration an Protein bzw. Ligand konstant und setzt sich aus der Menge an ungebundenen (freien) Protein bzw. Ligand und der Menge an Protein-Ligand-Komplex zusammen:

$$\begin{aligned} P_t &= P + PL_n \\ L_t &= L + n PL_n \end{aligned} \quad (7.2)$$

Für die Vorlage eines Gleichgewichtes erhalten wir über das Massenwirkungsgesetz für die Reaktion (7.1) die dazugehörige  $K_D$ , wobei wir annehmen, dass eine ideal verdünnte Lösung vorliegt und die Aktivitäten für P, L und  $PL_n$  durch die entsprechenden Gleichgewichtskonzentrationen  $[P]$ ,  $[L]$  und  $[PL_n]$  ersetzt werden können:

$$K_D \equiv \frac{[a_P][a_L]^n}{[a_{PL_n}]} \approx \frac{[P][L]^n}{[PL_n]} \quad (7.3)$$

Der Vorzug der  $K_D$  gegenüber der Assoziationskonstante  $K_A = 1/K_D$  motiviert sich dadurch, dass  $K_A$  weniger anschaulich ist, als die  $K_D$ . So ist die Einheit der  $K_D$   $[M]$  (mol je Liter) die einer Konzentration und sie wird um so kleiner, je stärker das Gleichgewicht auf der Seite des Komplexes liegt. Demgegenüber hat die Assoziationskonstante die Einheit  $[1/M]$  und wird um so größer, je mehr das Gleichgewicht auf der Seite des Komplexes liegt.

Die  $K_D$  lässt sich auch dynamisch als das Gleichgewicht deuten, dass sich zwischen der Zerfalls- und Bildungsreaktion des Protein-Ligand-Komplexes der Reaktion (7.1) mit

$n = 1$  einstellt:

$$\begin{aligned} \frac{d\text{PL}}{dt} &= k_{\text{on}} \times \text{P} \times \text{L} - k_{\text{off}} \times \text{PL} = 0 \\ \Rightarrow K_{\text{D}} &\equiv \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \end{aligned} \quad (7.4)$$

Hierbei sind  $k_{\text{off}}$  und  $k_{\text{on}}$  die Reaktionsgeschwindigkeiten der Zerfalls- und Bildungsreaktion. Wir verringern die  $K_{\text{D}}$  wenn wir  $k_{\text{off}}$  verringern und/oder  $k_{\text{on}}$  erhöhen. Letztere wird aber nach oben durch Diffusion der beiden Edukte begrenzt.

**Die freie molare Reaktionsenthalpie** Die  $\Delta G^\circ$  für die Reaktion (7.1) ist definiert als die Änderung der freien Enthalpie eines mols an Protein-Ligand-Komplex gegenüber den freien Enthalpien eines mol an freiem Protein und  $n$  mol freiem Ligand:

$$\Delta G^\circ = -G_{\text{P}} - n G_{\text{L}} + G_{\text{PL}_n} \quad (7.5)$$

Verknüpft mit der Dissoziations- bzw. Assoziationskonstante lautet  $\Delta G^\circ$  für die Reaktion (7.1):

$$\Delta G^\circ = RT \ln \left( \frac{K_{\text{D}}}{1 \text{ M}} \right) = -RT \ln (1 \text{ M} \times K_{\text{A}}) \quad (7.6)$$

Dabei ist  $R$  die universelle Gaskonstante und  $T$  die absolute Temperatur. Der Term  $1 \text{ M}$  bedeutet ein mol je Liter und normiert die Dissoziations- bzw. Assoziationskonstante.

Häufig wird zwischen der freien Enthalpie für die Dissoziation und Assoziation unterschieden, wobei der Unterschied lediglich im Vorzeichen besteht, entsprechend dem Zerfall oder der Bildung von  $\text{PL}_n$ . Die freie Bildungsenthalpie hat ein negatives Vorzeichen, wenn die Reaktion (7.1) freiwillig von links nach rechts abläuft. Die freie Zerfallsenthalpie hätte dann entsprechend ein positives Vorzeichen. In dieser Arbeit beziehen wir uns stets nur auf die freie Bildungsenthalpie, wie sie in (7.6) angegeben ist.

Die freie molare Reaktionsenthalpie  $\Delta G^\circ$  kann als Summe über alle freien molaren Reaktionsenthalpien  $\Delta G_i^\circ$  aller  $m$  Teilprozesse der Reaktion (7.1) geschrieben werden:

$$\Delta G^\circ = \sum_{i=1}^m \Delta G_i^\circ \quad (7.7)$$

Die Art der Aufteilung  $\Delta G^\circ$  hängt von der jeweils gewünschten Betrachtung bzw. jeweils verwendete Messmethode ab. So kann nach Froloff et al. [41] die freie molare Reaktionsenthalpie in elektrostatische, unpolare und konformationelle Anteile zerlegt werden. Für das Verfahren der isothermen Titrationskalorimetrie kann  $\Delta G^\circ$ , analog zur Darstellung

in [7, 89], in Anteile der intrinsichen Bindung, der konformationellen Änderungen von Protein und Ligand bei der Bindung, Austausch von Protonen bei der Bindung, Solvatisierungen usw. aufgeteilt werden, d. h. in jeden an der Reaktion (7.1) beteiligten Prozess.

Auch die gemessene Dissoziationskonstante ist ein Wert über alle beobachteten Teilprozesse der Reaktion (7.1). Wegen der Verknüpfung (7.6) der Dissoziationskonstante mit der freien molaren Reaktionsenthalpie, erhalten wir für die Gesamt- $K_D$ :

$$K_D = 1 \text{ M} \prod_{i=1}^m \exp \left[ \frac{\Delta G_i^\circ}{RT} \right] = 1 \text{ M} \prod_{i=1}^m \left( \frac{K_{D,i}}{1 \text{ M}} \right) \quad (7.8)$$

Der Wert der ermittelten  $K_D$  hängt damit auch – wie  $\Delta G^\circ$  – davon ab, welche Teilreaktionen von (7.1) mit den jeweils verwendeten Methoden gemessen werden.

In dieser Arbeit ist die reine Angabe der  $K_D$  bzw.  $\Delta G^\circ$  zwar interessant, wirklichen Nutzen im Sinne der Entwicklung höher affiner Liganden bringt allerdings erst der Vergleich der Affinität des zu untersuchenden Liganden mit der einer nützlichen Referenz. Wegen der Additivität von  $\Delta G^\circ$  verwenden wir die Differenz  $\Delta\Delta G$ :

$$\Delta\Delta G \equiv \Delta G_{\text{Lig}}^\circ - \Delta G_{\text{Ref}}^\circ \quad (7.9)$$

**Die molare Reaktionsenthalpie und -entropie** Die für uns so wichtige freie molare Reaktionsenthalpie  $\Delta G^\circ$  ist ein thermodynamisches Potential mit den unabhängigen Parametern der Temperatur  $T$  und des Druckes  $p$ , wobei die Temperatur und der Druck während unserer Messungen konstant bleiben. Per definitionem setzt sich  $\Delta G^\circ$  aus der molaren Reaktionsenthalpie pro Formelumsatz ( $\Delta H$ ) und molaren Reaktionsentropie pro Formelumsatz ( $\Delta S$ ) zusammen [70]:

$$\Delta G^\circ = \Delta H - T \Delta S \quad (7.10)$$

Innerhalb dieser Arbeit werden wir uns statt auf  $\Delta S$ , auf die entropische molare Reaktionsenergie pro Formelumsatz ( $-T \Delta S$ ) beziehen. Der Vorteil liegt in der besseren Vergleichbarkeit von Enthalpie und entropischer Energie und deren Anteil an der freien Enthalpie  $\Delta G^\circ$  begründet, da die freie Enthalpie dann einfach die Summe aus Enthalpie und entropischer Energie ist.

Ersetzen wir jedes  $\Delta G_i^\circ$  in (7.7) mit der Definition der freien Enthalpie, so folgt, dass

auch  $\Delta H$  und  $\Delta S$  bzw.  $-T \Delta S$  additiv sind:

$$\begin{aligned}\Delta H &= \sum_{i=1}^m \Delta H_i \\ -T \Delta S &= -T \sum_{i=1}^m \Delta S_i\end{aligned}\tag{7.11}$$

Die Druckabhängigkeit von  $\Delta G^\circ$  ist für unsere Belange vernachlässigbar, jedoch wollen wir hier kurz auf die für uns wichtigere Temperaturabhängigkeit von  $\Delta G^\circ$  eingehen. Dabei sind  $\Delta H$  und  $\Delta S$  mit der Temperatur über die  $\Delta C_p$  verbunden [70]:

$$\begin{aligned}\Delta H(T_2) &= \Delta H(T_1) + \int_{T_1}^{T_2} \Delta C_p dT \\ \Delta S(T_2) &= \Delta S(T_1) + \int_{T_1}^{T_2} \frac{\Delta C_p}{T} dT\end{aligned}\tag{7.12}$$

Hierbei ist  $T_1$  die Ausgangstemperatur und  $T_2$  die Endtemperatur. Aufgrund der Definition von  $\Delta G^\circ$  (siehe (7.5)) und den davon abgeleiteten Definitionen für  $\Delta H$  und  $\Delta S$  ist  $\Delta C_p$  die Differenz der Wärmekapazität eines mols an Protein-Ligand-Komplex gegenüber den Wärmekapazitäten eines mols an freiem Protein und  $n$  mol an freiem Ligand. Wegen der Additivität von  $\Delta H$  und  $\Delta S$  ist auch  $\Delta C_p$  additiv.

$\Delta C_p$  reflektiert die Änderung in der Dispersion der Enthalpie bzw. Entropie und damit auch die Änderung an möglichen Zuständen für den Protein-Ligand-Komplex gegenüber den freien Komponenten. Sie wird negativ, wenn der Komplex weniger freie Zustände besitzt, als die freien Komponenten und positiv, wenn die möglichen Zustände des Protein-Ligand-Komplexes gegenüber den freien Komponenten zunimmt. Allgemein geht man davon aus, dass ein negativer Wert für  $\Delta C_p$  eine hydrophobe und eine positiver Wert eine hydrophile Interaktion zwischen Protein und Ligand bedeutet [47, 90, 27]. Ist der Wert für  $\Delta C_p$  nahe null kann daher von einer Kompensation von hydrophober und hydrophiler Interaktion gesprochen werden.

**Zusammenhang zwischen Dissoziationskonstante und molarer Reaktionsenthalpie und -entropie** Wir können mit der Definition der freien Enthalpie (7.10) und der Beziehung zwischen der freien Enthalpie und der Dissoziationskonstante  $K_D$  (7.6) für die Dissoziationskonstante eine Beziehung zur Enthalpie und Entropie der Reaktion herstellen:

$$K_D = M \exp \left[ -\frac{\Delta S}{R} \right] \exp \left[ \frac{\Delta H}{RT} \right]\tag{7.13}$$

## Einleitung

Mit dieser Gleichung ist wiederum eine Verbindung zur kinetischen Definition (7.4) der Dissoziationskonstante möglich. Dazu betrachten wir die Arrhenius-Gleichung [2], die eine Verknüpfung zwischen der Temperatur und der Reaktionsgeschwindigkeit  $k$  herstellt:

$$k = A \exp \left[ -\frac{E_a}{RT} \right] \quad (7.14)$$

Hierbei ist  $E_a$  die Aktivierungsenergie, d. h. die Energie, die notwendig ist, um vom einem Zustand  $Z_1$  nach  $Z_2$  zu gelangen. Der Faktor  $A$  ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, die wir beobachten würden, wenn die Temperatur unendlich hoch oder die Aktivierungsenergie null wäre. Für die Reaktion (7.1) haben wir nun zwei Reaktionskonstanten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$ , jeweils für die Hin- und die Rückreaktion, mit entsprechend  $E_{a,\text{on}}$  und  $E_{a,\text{off}}$  den Aktivierungsenergien und  $A_{\text{on}}$  und  $A_{\text{off}}$  den maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten der Hin- und Rückreaktion. Mit der kinetischen Definition der Dissoziationskonstante (7.4) und der Arrhenius-Gleichung erhalten wir:

$$K_D = \frac{A_{\text{off}}}{A_{\text{on}}} \exp \left[ \frac{E_{a,\text{on}} - E_{a,\text{off}}}{RT} \right] \quad (7.15)$$

Durch Vergleich mit (7.18) können wir für die Enthalpie  $\Delta H$  ableiten:

$$\Delta H = E_{a,\text{on}} - E_{a,\text{off}} = \Delta E_a \quad (7.16)$$

D. h. die molare Reaktionsenthalpie ist die Nettoenergie  $\Delta E_a$ , die bei der Reaktion frei wird bzw. aufgewendet werden muss, um den Protein-Ligand-Komplex zu bilden. Wir werden diese Nettoenergie kalorimetrisch als Wärme bestimmen. Wird bei der Reaktion dabei Wärme frei (exotherme Reaktion), ist der Protein-Ligand-Komplex *energetisch* stabiler als die freien Komponenten.

Durch Vergleich von (7.18) mit (7.15) erhalten wir für die molare Reaktionsentropie:

$$\Delta S = -R \ln \left[ \frac{A_{\text{off}}}{M A_{\text{on}}} \right] = -R \ln \left[ \frac{K_D^{\text{ent}}}{M} \right] \quad (7.17)$$

Diese Gleichung ist äquivalent zur Boltzmann-Formulierung der Entropie  $S = k_B \ln \Omega$ , wobei dort  $k_B$  die Boltzmannkonstante und  $\Omega$  die Anzahl von Mikrozuständen ist. In unserem Fall haben wir es nicht mit der Entropie  $S$ , sondern mit der Differenz der molaren Entropien der gebundenen und der freien Komponenten zu tun (d. h.  $N_A (S_{\text{gebunden}} - S_{\text{frei}})$ ), daher verwenden wir die Gaskonstante  $R$ . Die molare Reaktionsentropie beschreibt also die Änderung der möglichen Mikrozustände eines mol an Komplexes gegenüber den

freien Komponenten. Es ist dabei zu berücksichtigen, dass die Einheit von  $A_{\text{off}}$  [1/s] und für  $A_{\text{on}}$  [1/(sM)] beträgt. Analog zur Definition der  $K_{\text{D}}$  über  $k_{\text{off}}$  und  $k_{\text{on}}$  in (7.4), lässt sich hier eine entropische Dissoziationskonstante  $K_{\text{D}}^{\text{ent}}$  definieren:  $K_{\text{D}}^{\text{ent}} = A_{\text{off}}/A_{\text{on}}$ . Dieser Parameter beschreibt die Lage des Gleichgewichtes für die Reaktion (7.1) unter expliziten Ausschluss enthalpischer Effekte, d. h. für  $\Delta E_a = 0$ . Die  $K_{\text{D}}$  kann damit auch geschrieben werden als:

$$K_{\text{D}} = K_{\text{D}}^{\text{ent}} \exp \left[ \frac{\Delta H}{RT} \right] \quad (7.18)$$

Ist die Bildung des Protein-Ligand-Komplexes eher unwahrscheinlich, d. h.  $K_{\text{D}}^{\text{ent}}$  ist gross, so muss bei der Bindung ein hoher Betrag an Energie frei werden, soll die  $K_{\text{D}}$  dennoch klein werden.

Stellen wir uns ein Protein und einen Liganden in einem Lösungsmitteltropfen im Gleichgewicht vor, so können wir prinzipiell die (verallgemeinerten) Koordinaten  $q$  und Impulse  $p$  des Systems in einem Phasenraum darstellen [48]. Das System entwickelt sich in der Zeit entlang einer Trajektorie durch diesen Phasenraum, wobei jeder Punkt der Trajektorie die Konfiguration des Systems zu einem bestimmten Zeitpunkt ist. Die Trajektorie des Systems im Gleichgewicht wird auch für einen unendlichen langen Zeitraum ein bestimmtes Gebiet des Phasenraums nicht verlassen, wobei wir dieses Gebiet in zwei Bereiche zerlegen können, in dem im ersteren das Protein und der Ligand dissoziiert und im zweiten assoziiert vorliegen. Wenn wir von enthalpischen Effekten absehen, so ist jeder Punkt des Gebietes gleichwertig. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Trajektorie vom nicht-bindenden in den bindenden Bereich wechselt ( $A_{\text{on}}$ ) bzw. verlässt ( $A_{\text{off}}$ ) hängt damit vom Verhältnis der Grösse beider Bereiche ab (siehe Abb. 7.1). Ist der bindende Bereich klein gegenüber dem nichtbindenden, so ist  $A_{\text{on}}$  klein,  $A_{\text{off}}$  gross und damit  $K_{\text{D}}^{\text{ent}}$  klein (siehe Abb. 7.1 A). Umgekehrt ist dann  $A_{\text{on}}$  gross,  $A_{\text{off}}$  klein und damit  $K_{\text{D}}^{\text{ent}}$  klein (siehe Abb. 7.1 B).

Führen wir die Enthalpieänderung  $\Delta H$  ein, so sind nun nicht mehr alle Punkte des Gleichgewichtgebiets des Systems gleichwertig. So kann sich die Trajektorie im bindenden Bereich durch enthalpische Effekte länger oder kürzer aufhalten, so dass die  $K_{\text{D}}$  für den Fall in Abb. 7.1 A kleiner als für den Fall in Abb. 7.1 B sein kann.

Im Wirkstoffdesign wird häufig eine Erhöhung der Affinität durch Erhöhung der hydrophoben Wechselwirkung von Protein und Ligand erreicht [69]. Wegen der Wechselwirkung mit den Wassermolekülen sind die möglichen Konfigurationen des dissoziierten Systems gegenüber dem assoziierten System eingeschränkt, so dass sich hier – über einer Verringerung von  $K_{\text{D}}^{\text{ent}}$  – eine Verringerung in der  $K_{\text{D}}$  ergibt.

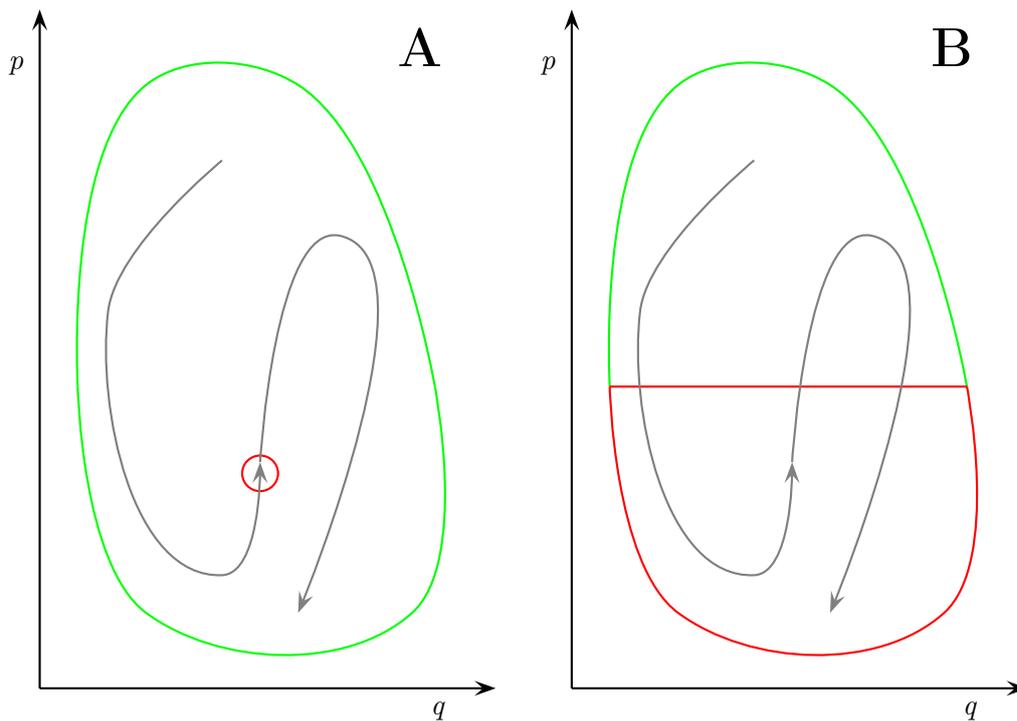


Abbildung 7.1.: Deutung der molaren Reaktionsentropie für die Bindung: Stellt man sich ein Protein und seinen Liganden in einem abgeschlossenen Lösungsmitteltropfen im Gleichgewicht vor, so kann die Veränderung des Systems als eine Trajektorie im Phasenraum dargestellt werden (graue Linien). Da sich das System im Gleichgewicht befindet, kann sich die Trajektorie nur in einem Teil des Phasenraums aufhalten, der hier grün und rot dargestellt ist, wobei der grüne Bereich den ungebundenen und der rote Bereich den gebundenen Zustand des Protein-Ligand-Komplexes meint. Die Trajektorie, deren Punkte die jeweils aktuellen Konfigurationen des Systems sind, bewegt sich nun zufällig in der Zeit durch das dem System mögliche Gebiet des Phasenraums und kann dabei den Bereich des gebundenen Zustandes durchqueren. Dabei ist leicht ersichtlich, dass die Grösse des Bereichs der Bindung, die Affinität des Protein-Ligand-Komplexes beeinflusst, entsprechend also  $A_{\text{off}}$  und  $A_{\text{on}}$ , sofern von enthalpischen Prozessen abgesehen wird. Je grösser der Bereich der Bindung gegenüber dem ungebundenen Bereich ist, desto stärker positiv wird  $\Delta S$  bzw. stärker negativ wird  $-T \Delta S$ , d. h.  $A_{\text{off}}$  wird klein und  $A_{\text{on}}$  grösser. Enthalpische Prozesse können die Affinität günstig beeinflussen, in dem sie die Aufenthaltsdauer bzw. den Verlauf der Trajektorie im bindenden Bereich erhöhen.

**Zusammensetzung von  $\Delta H$  und  $\Delta S$**  Wir sind in der Lage die gemessenen Gesamtenthalpie bzw. -entropie in jeden an der Bindung beteiligten Teilprozess zu zerlegen, genau wie  $\Delta G^\circ$ . So setzt sich bpsw. nach O'Brien et al. [87] die Enthalpie wie folgt zusammen:

$$\Delta H = \Delta H_{\text{int}} + \Delta H_{\text{konf}} + n_{\text{H}^+} \left( \Delta H_{\text{ion}}^{\text{Komplex}} + \Delta H_{\text{ion}}^{\text{Puffer}} \right) \quad (7.19)$$

Dabei ist  $\Delta H_{\text{int}}$  die intrinsische Reaktionsenthalpie, die beobachtet werden würde, wenn Ligand und Protein im gebundenen und im freien Zustand die gleiche Konformation besäße.  $\Delta H_{\text{konf}}$  ist die konformationelle Reaktionsenthalpie, die die notwendigen Konformationsänderungen widerspiegeln, die bei der Bindung auftreten. Die Enthalpien  $\Delta H_{\text{ion}}^{\text{Komplex}}$  und  $\Delta H_{\text{ion}}^{\text{Puffer}}$  sind die Ionisierungsenthalpien, die entstehen, wenn es bei der Bindung zum Austausch von Protonen kommt. Der Faktor  $n_{\text{H}^+}$  ist die Anzahl an ausgetauschten Protonen. Die Ionisierungsenthalpie  $\Delta H_{\text{ion}}^{\text{Puffer}}$  hängt auch von der Art des Puffers ab und kann durch entsprechende Auswahl des Puffers verstärkt oder abgeschwächt werden [47] (Der von uns verwendete Phosphatpuffer hat eine kleine Ionisierungsenthalpie [47]). Es sei darauf hingewiesen, dass die Einzelterme in (7.19) selbst wieder als eine Summe von Einzelenthalpien aufgefasst werden können.

Die in (7.19) gemachten Zerlegung lässt sich natürlich auf die Reaktionsentropie, die freie Enthalpie und damit auf die beobachtete  $K_D$  übertragen. Eine Konsequenz daraus ist, dass die mit verschiedenen Messmethoden bestimmte Dissoziationskonstante für gleiche Protein–Ligand Kombinationen unter den gleichen Puffer- und Temperaturbedingungen durchaus *unterschiedliche* Werte annehmen kann. In dieser Arbeit verwenden wir bpsw. die Änderung der Fluoreszenzintensität des Tryptophans bei Bindung des Liganden und die Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) zur Bestimmung der  $K_D$ . Dabei messen wir für die Fluoreszenz nur die Änderungen um das Fluorophor, und damit möglicherweise nur einen Teil der Bindungsereignisse, wie sie in (7.19) dargelegt sind. Demgegenüber ist die ITC in der Lage die Gesamtenthalpie  $\Delta H$  zu bestimmen, was aber nicht bedeuten muss, dass die ITC immer die Gesamtreaktion abbildet: Teilprozesse der Bindung, die nicht enthalpisch wirksam sind, sind für die ITC unsichtbar. Es ist daher nun die Ansicht des Autors, dass es keinen Sinn macht bei statistisch relevanten Differenzen für die  $K_D$  für verschiedenen Messmethoden nach der *richtigen*  $K_D$  zu fragen. Die Dissoziationskonstante beschreibt die Lage des Gleichgewichtes der jeweiligen beobachteten Reaktion oder deren Teilschritte. Statt also nach der richtigen  $K_D$  (entsprechend: nach der richtigen Reaktion), wäre es besser eher nach der relevanten Reaktion und der dazugehörigen  $K_D$  zu fragen, z. B. nach der intrinsischen  $K_D$ . Das bedeutet allerdings einen gesteigerten Messaufwand. Und letztlich sind wir auch gar nicht an der  $K_D$  der

## Einleitung

Reaktion (7.1) interessiert, sondern an der Stärke der Inhibition des interessierenden Protein-Protein-Komplex durch den Liganden (unter physiologischen Bedingungen). Das bedeutet aber meist einen sehr gesteigerten Messaufwand. Ausserdem ist die  $K_D$  von (7.1) im allgemeinen ein ausreichender *Anhaltspunkt* für die zu erwartenden Inhibitionsleistung des Liganden. Wie auch immer: statistisch signifikante Unterschiede für die  $K_D$  gleicher Protein-Ligand-Titrations liefern uns wertvolle Informationen über den Ablauf der Bindung, da sie uns – quasi gratis – eine Zerlegung der freien Enthalpie  $\Delta G^\circ$  im Sinne von (7.19) liefern können. Dabei liefert die ITC eine  $K_D$  bzw.  $\Delta G^\circ$  über alle enthalpisch wirksamen Reaktionen, während die Fluoreszenz alle Reaktionen abbildet, die zu Änderung der Intensität aller beobachteten Fluorophore führt (d. h. auch Reaktionen die rein entropisch wirksam sind).



## 8. Gleichungen für Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes [PL]

Nachfolgend werden die Modelle zur Schätzung der Dissoziationskonstante der Reaktion (7.1) hergeleitet bzw. dargestellt.

### 8.1. Stöchiometrie gleich eins

Für  $n = 1$  wird (7.2) in (7.3) eingesetzt und so umgestellt, dass wir eine quadratische Gleichung in ihrer Normalform erhalten:

$$0 = [\text{PL}]^2 - [\text{PL}] (\text{P}_t + \text{L}_t + K_D) + \text{P}_t \text{L}_t \quad (8.1)$$

Die allgemeine Lösung für diese quadratische Gleichung lautet natürlich:

$$x_{1,2} = -\frac{p}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{p}{2}\right)^2 - q}$$

Dabei ist  $x = [\text{PL}]$ ,  $p = -(\text{P}_t + \text{L}_t + K_D)$  und  $q = \text{P}_t \text{L}_t$ .

Die allgemeine Lösung besteht aus zwei verschiedenen Werten für [PL], wovon nur einer physikalisch sinnvoll ist. Die Konzentration von [PL] kann wegen der angenommenen Reaktion im Extremfall ( $K_D = 0$ ) nur genauso groß sein, wie die totale Konzentration des Bindungspartners mit der niedrigeren Konzentration:  $[\text{PL}] = \min(\text{P}_t, \text{L}_t)$ . Für jede reale  $K_D$  (d. h.  $K_D > 0$ ) ist [PL] aber stets kleiner:  $[\text{PL}] < \min(\text{P}_t, \text{L}_t)$ . Nehmen wir nun an, dass die physikalisch sinnvolle Lösung diejenige sei, bei der die Summe aus der Wurzel mit  $-p/2$  gebildet wird. Dann würde für jede reale  $K_D$  gelten:  $[\text{PL}] > \min(\text{P}_t, \text{L}_t)$ , da für jede  $K_D$   $-p/2 \geq \min(\text{P}_t, \text{L}_t)$  und die Wurzel nicht negativ werden kann. Daher lautet die physikalisch sinnvolle Lösung:

$$[\text{PL}] = \frac{1}{2} \left( \text{P}_t + \text{L}_t + K_D - \sqrt{(\text{P}_t + \text{L}_t + K_D)^2 - 4 \text{P}_t \text{L}_t} \right) \quad (8.2)$$

## 8.2. Stöchiometrie ungleich eins

Für  $n \neq 1$ , insbesondere bei der Annahme  $n \in \mathbb{R}$ , können wir keine explizite Gleichung für  $[\text{PL}]$  wie in (8.2) angeben. Beim Einsetzen von (7.2) in (7.3) erhalten wir statt dessen nach Umstellen die implizite Funktion:

$$0 = \left( \frac{P_t}{[\text{PL}_n]} - 1 \right) (L_t - n [\text{PL}_n])^n - K_D \quad (8.3)$$

Um dennoch eine explizite Lösung für den Fall  $n \neq 1$  zu erzwingen, findet man auch folgenden Ansatz [82, 116], bei dem die totale Proteinkonzentration  $P_t$  mit einem Korrekturfaktor  $N$  belegt wird:

$$[\text{PL}] = \frac{1}{2} \left( N P_t + L_t + K_D - \sqrt{(N P_t + L_t + K_D)^2 - 4 N P_t L_t} \right) \quad (8.4)$$

Für diese Herangehensweise wird ausgenutzt, dass für  $n = 1$  ein Mol Protein-Ligand-Komplex ein Mol Protein ein Mol Ligand bindet. Entsprechend ist  $N$  dann eins. Für  $n = 2$  bindet ein Mol Protein zwei Mol Ligand. Beschreiben wir das wie eine eins-zu-eins Bindung, so erscheint die totale Konzentration des Proteins verdoppelt, entsprechend ist  $N$  dann zwei. Binden stattdessen zwei Mol Ligand ein Mol Protein, so erscheint bei einer eins-zu-eins Beschreibung die totale Konzentration des Proteins halbiert, entsprechend ist  $N = 0,5$ .

Analog zu (8.4) kann auch die totale Konzentration den Liganden mit einem Korrekturfaktor  $M$  belegt werden, was sich anbietet wenn der Ligand über identische und unabhängige Bindungsstellen verfügt:

$$[\text{PL}] = \frac{1}{2} \left( P_t + M L_t + K_D - \sqrt{(P_t + M L_t + K_D)^2 - 4 M P_t L_t} \right) \quad (8.5)$$

Zwischen  $N$  und  $M$  besteht die Beziehung  $N = 1/M$ .

Es sei hier aber darauf hingewiesen, dass die Korrekturfaktoren  $N$  bzw.  $M$  ihre Bedeutung als stöchiometrische Koeffizienten nur dann erhalten, wenn die totale Konzentration  $P_t$  und  $L_t$  genau genug bekannt sind. Besteht zwischen der angesetzten Konzentration und der realen Konzentration für Protein oder Ligand ein Unterscheid, so wirkt  $N$  oder  $M$  als Korrekturfaktor der totalen Konzentration von Protein oder Ligand und sagt *nichts* über die Stöchiometrie der Reaktion aus.

## 9. Methoden zur Bestimmung der Dissoziationskonstante über Messung der Fluoreszenzintensität von Tryptophan

Glücklicherweise enthalten alle EVH1-Domänen der Ena/VASP-Familie ein direkt an der Bindung beteiligtes Tryptophan [10]. Die speziellen fluoreszenten Eigenschaften dieser Aminosäure können wir als Reporter für die Bindung nutzen und so die Dissoziationskonstante bestimmen [72].

Wir gehen nun davon aus, dass die gemessene Gesamtintensität  $F$  eine Summe der Einzelintensitäten  $F_i$  der  $i$ ten Fluorophorpopulation sei:  $F = \sum_i F_i$ . Wir haben in unserem Falle nach (7.1) prinzipiell vier Einzelpopulationen:

$$F = F_P + F_L + F_{PL} + F_B \quad (9.1)$$

Dabei ist  $F_P$  die Intensität des freien Proteins,  $F_L$  des freien Liganden,  $F_{PL}$  des Protein-Ligand-Komplexes und  $F_B$  ist die akkumulierte Intensität von allem, was nicht den drei vorher genannten entspricht<sup>1</sup>.

Bei ausreichender Verdünnung der Fluorophore und bei Abwesenheit von Filtereffekten sind die drei Intensitäten  $F_P$ ,  $F_L$  und  $F_{PL}$  direkt proportional zur jeweiligen Konzentration:

$$\begin{aligned} F_P &= \alpha P \\ F_L &= \beta L \\ F_{PL} &= \gamma PL_n \end{aligned} \quad (9.2)$$

---

<sup>1</sup>Es sei daran erinnert, dass mit einem Fluoreszenzspektrometer mehr als nur die Fluoreszenz gemessen werden kann und auch andere Effekte, wie die Raman-Streuung oder trübe Lösungen, einen Einfluss auf das gemessene Signal haben [72]. Wir sprechen eben daher von  $F_i$  als gemessener Intensität und subsummieren damit alle Effekte, die zum Signal beitragen, in einen Wert.

Einsetzen von (9.2) und (7.2) in (9.1), liefert nach Umstellen für die gemessene Gesamtintensität  $F$  beim Vorliegen eines Gleichgewichtszustandes für (7.1):

$$F = \alpha P_t + \beta L_t + \overbrace{(\gamma - \alpha - n\beta)}^{=\delta} [PL_n] + F_B \quad (9.3)$$

Es kann nur dann eine Fluoreszenz-Titration durchgeführt werden kann, wenn  $\gamma \neq \alpha + n\beta$  bzw.  $\delta \neq 0$  ist. D. h. die Bindung muss zu einem Unterschied in der Intensität des Protein-Ligand-Komplexes gegenüber den freien Komponenten führen.

Die Gleichung (9.3) ist der Ausgangspunkt für die Schätzung der  $K_D$  über die Messung der Änderung der Intensität des Tryptophans. Alle weiteren Ausführungen betreffen vor allem die Variation von  $L_t$  und  $P_t$ . Dabei haben wir prinzipiell zwei Herangehensweisen: (i) den klassischen Ansatz, bei dem zu einer vorgelegten Proteinlösung schrittweise Ligandlösung gegeben wird, auch *Fluoreszenztitration* genannt (bzw. kurz FT), und (ii) die kontinuierliche und gegenläufige Variation der Konzentration von Protein- und Ligandlösung, im englischen *Continuous Variation Method* bzw. kurz CVM.

## 9.1. Fluoreszenztitration

Im allgemeinen wird bei der Fluoreszenztitration so gearbeitet, dass sich das Anfangsvolumen  $V_0$  durch die Zugabe der Ligandlösung nicht ändert. Dies erfordert das  $V_0$  groß und das zugegebene Gesamtvolumen an Ligandlösungen vernachlässigbar ist. Da wir aber sparsam arbeiten möchten, wollen wir das Anfangsvolumen  $V_0$  klein halten und damit die benötigte Menge an Protein und Ligand. Würden wir nun eine Volumenkonstanz während der Messung anstreben, so müsste nun die Konzentration des Liganden sehr hoch und die Injektionsvolumina sehr klein gewählt werden. Das möchten wir vermeiden, da die Löslichkeit der Liganden zum einen eingeschränkt ist, zum anderen die Verwendung sehr kleiner Injektionsvolumina den Fehler für  $L_t$  sehr groß werden lassen kann.

Statt den Verdünnungseffekt umständlich umgehen zu wollen, ist es wesentlich einfacher die Verdünnung mit in das Titrationsmodell aufzunehmen. Dabei wird dann nicht mehr, wie sonst üblich, die Ligandkonzentration  $L_t$  als erklärende Variable geführt, sondern die kumulierte Summe  $\Delta V$  der Einzelinjektionsvolumina  $dV_i$  des Liganden:

$$\Delta V = \sum_{i=1}^x dV_i \quad (9.4)$$

Dabei ist  $x$  die Anzahl der hinzu gefügten Teilmolumina.

## Einleitung

Bei der Zugabe der Titrationsvolumina soll es zu einer vollständigen Vermischung kommen und sich das Gesamtvolumina entsprechen  $V_{\text{gesamt}} = V_0 + \Delta V$  erhöhen. Die Verringerung der Protein- und die Erhöhung der Ligand-Konzentration kann dann entsprechend über den Dreisatz gebildet werden, wobei wir das Vorliegen einer idealen Lösung annehmen:

$$\begin{aligned} P_t &= P_t^\circ \frac{V_0}{V_0 + \Delta V} \\ L_t &= L_t^\circ \frac{\Delta V}{V_0 + \Delta V} \end{aligned} \quad (9.5)$$

Dabei sind  $P_t^\circ$  und  $L_t^\circ$  die initiale Protein-Konzentration in der Küvette bzw. die Konzentration der zu titrierenden Ligandlösung. Die Konzentrationen  $P_t$  und  $L_t$  sind dann die jeweils aktuellen totalen Konzentrationen in der Küvette nach der  $i$ ten Zugabe von Ligandlösung. Ersetzen wir nun  $P_t$  und  $L_t$  in (9.3), so erhalten wir für die gemessene Gesamtintensität:

$$F = \frac{1}{(V_0 + \Delta V)} \left( \overbrace{\alpha P_t^\circ}^{=F_{P_t^\circ}} V_0 + \overbrace{\beta L_t^\circ}^{=F_{L_t^\circ}} \Delta V \right) + \delta [PL_n] + F_B \quad (9.6)$$

Dabei ist  $F_{P_t^\circ}$  die Intensität der unverdünnten Proteinlösung in der Küvette und  $F_{L_t^\circ}$  ist die Intensität der unverdünnte Ligandenlösung. Wir stellen diese Gleichung nun so um, dass wir folgende Gleichung erhalten:

$$\underbrace{F \left( 1 + \frac{\Delta V}{V_0} \right) - \overbrace{(F_{P_t^\circ} + F_B)}^{=F_0}}_{=\Delta F} = \delta \left( 1 + \frac{\Delta V}{V_0} \right) [PL_n] + \frac{\Delta V}{V_0} \overbrace{(F_{L_t^\circ} + F_B)}^{=F_{LB}} \quad (9.7)$$

Bei dieser Gleichung sind auf der linken Seite alle bekannten, weil gemessenen Werte vorhanden: Die Gesamtintensität  $F$ , die Intensität  $F_0$  (die Anfangsintensität der Proteinlösung vor der Zugabe von Ligand inklusive eines konstanten Hintergrundes), das Anfangsvolumen  $V_0$  und die kumulierte Summe  $\Delta V$  der Einzelinjektionsvolumina. Auf der rechten Seite sind die unbekannt Parameter: der Proportionalitätsfaktor  $\delta$ , die Konzentration an Protein-Ligand-Komplex  $[PL_n]$  und die Hintergrundintensität  $F_{LB}$  des Liganden.

Die Hintergrundintensität  $F_{LB}$  kann am sparsamsten bestimmt werden, indem die Pufferlösung mit der Ligandlösung titriert wird. Aus (9.7) folgt dann mit  $F_{P_t^\circ} = 0$  und

$PL_n = 0$  für die Hintergrundintensität  $F_{LB}$ :

$$F \left( 1 + \frac{\Delta V}{V_0} \right) - F_B = \frac{\Delta V}{V_0} F_{LB} \quad (9.8)$$

Dieses Modell erlaubt die Bestimmung von  $F_{LB}/V_0$  aus den gemessenen Daten für den Hintergrund über einen linearen Fit.

Die Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes im Gleichgewicht für  $n = 1$  bei Berücksichtigung der Verdünnung erhalten wir durch Einsetzen von (9.5) in (8.2) und umstellen:

$$[PL] = \frac{1}{2(V_0 + \Delta V)} \left( \Delta V (L_t^\circ + K_D) + V_0 (P_t^\circ + K_D) - \sqrt{(\Delta V (L_t^\circ + K_D) + V_0 (P_t^\circ + K_D))^2 - 4 P_t^\circ L_t^\circ V_0 \Delta V} \right) \quad (9.9)$$

Wir setzen dies in (9.7) ein und subtrahieren von  $\Delta F$  den separat bestimmten Hintergrund  $F_{LB}/V_0$ . Wir erhalten letztendlich das Modell zur Bestimmung der Dissoziationskonstante für  $n = 1$ :

$$\Delta F - \frac{F_{LB}}{V_0} \Delta V = \frac{\delta}{2} \left( \frac{\Delta V}{V_0} (L_t^\circ + K_D) + P_t^\circ + K_D - \sqrt{\left( \frac{\Delta V}{V_0} (L_t^\circ + K_D) + P_t^\circ + K_D \right)^2 - 4 P_t^\circ L_t^\circ \frac{\Delta V}{V_0}} \right) \quad (9.10)$$

Analog zu (8.4) bzw. (8.5) kann in dieser Gleichung ein zusätzlicher Parameter aufgenommen werden, der die Protein- oder Ligand-Konzentration als anzupassenden Parameter kennzeichnet (als  $N \times P_t^\circ$  oder  $M \times L_t^\circ$ ), um entweder die Stöchiometrie der Reaktion (7.1) zu erhalten oder um die Konzentration von  $P_t^\circ$  oder  $L_t^\circ$  als anzupassenden Parameter auszuweisen.

## 9.2. Kontinuierliche Variation

Bei der Methode der kontinuierlichen Variation (auch bekannt unter der Bezeichnung Job-Plot) werden die Protein- und die Ligandenkonzentration gegenläufig und linear variiert, wobei die Summe der Konzentrationen aus Protein und Ligand konstant bleibt  $C = P_t + L_t$  [88, 64, 5, 4, 62, 58, 59]. Der Einsatz dieser Methode beschränkt sich fast ausschliesslich auf die Bestimmung der Stöchiometrie einer Reaktion. Dabei wird ausgenutzt, dass die

Lage des Maximums der Titrationskurve mit der Stöchiometrie korreliert.

Die Vorteile der Methode für die Bestimmung der Dissoziationskonstante sind: (i) die Information zum Hintergrund, die in der FT separat bestimmt werden muss, ist in der Messung implizit enthalten, (ii) der Verbrauch des Liganden kann mit dieser Methode weiter minimiert werden.

### 9.2.1. CVM für die Stöchiometrie gleich eins – die explizite CVM

Wir erweitern die Methode der kontinuierlichen Variation, in dem wir von der erklärenden Variable des Stoffmengenanteils  $X_L$  des Liganden auf den Volumenanteil  $\phi_L$  der Ligandenlösung umstellen. D. h. statt  $C = P_t + L_t$  fordern wir nun, dass die Summe der Volumenanteile  $\phi_P$  bzw.  $\phi_L$  der Protein- bzw. der Ligandlösung eins betrage:  $1 = \phi_L + \phi_P$ .

Der Zweck ist die Aufhebung der Forderung nach Konstanz der Summe aus Protein- und Ligandkonzentration. Das uns interessierende Signal ist die Änderung der Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes, d. h. das Signal hängt von der  $K_D$ ,  $P_t$  und  $L_t$  ab (siehe (8.2)). Da die zu erwartende  $K_D$  im mikromolaren Bereich liegt, bedeutet die Forderung nach Equimolarität eine Erhöhung des Verbrauchs von Protein und Ligand, um ein ausreichend messbares Signal zu erhalten. Nach (8.2) können wir aber die Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes aber auch erhöhen, wenn wir einseitig die Konzentration des Liganden gegenüber der des Proteins erhöhen. Dann können wir aus der Stelle für das Maximum der Kurve aber nicht mehr direkt auf die Stöchiometrie schliessen, da diese Stelle von  $K_D$ ,  $P_t$  und  $L_t$  abhängt.

Der Volumenanteil  $\phi_L$  der Ligandenlösung am Gesamtvolumen  $V_0 = V_L + V_P$  lautet:

$$\phi_L = \frac{V_L}{V_L + V_P} \quad (9.11)$$

Dabei ist  $V_L$  das Volumen der Ligandlösung und  $V_P$  ist das Volumen der Proteinlösung. Mischen wir nun den Volumenanteil  $\phi_L$  der Stammlösung des Liganden mit der Konzentration  $L_t^\circ$  mit dem Volumenanteil  $(1 - \phi_L)$  der Stammlösung des Proteins mit der Konzentration  $P_t^\circ$ , so lauten die totalen Konzentrationen für  $L_t$  und  $P_t$ :

$$\begin{aligned} L_t &= L_t^\circ \phi_L \\ P_t &= P_t^\circ (1 - \phi_L) \end{aligned} \quad (9.12)$$

Einsetzen von (9.12) und (9.2) in (9.3) liefert nach Umstellen mit  $F_{P_t^\circ} = \alpha P_t^\circ$  (die Intensität des unverdünnten Proteins) und  $F_{L_t^\circ} = \beta L_t^\circ$  (die Intensität des unverdünnten

Liganden) für die gemessene Gesamtintensität  $F$ :

$$F = \overbrace{\phi_L (F_{L_t^\circ} - F_{P_t^\circ}) + F_{P_t^\circ} + F_B}^{=F_{\text{lin}}} + \delta [\text{PL}_n] \quad (9.13)$$

$=\bar{F}_{P_t^\circ}$

Die Intensitäten  $F_{L_t^\circ}$  und  $F_{P_t^\circ}$  sind im allgemeinen nicht direkt messbar, statt dessen wird die Summe  $\bar{F}_{P_t^\circ} = F_{P_t^\circ} + F_B$  bzw.  $\bar{F}_{L_t^\circ} = F_{L_t^\circ} + F_B$  bestimmt, mit einer unbekanntem Hintergrundintensität  $F_B$ . Wegen  $\bar{F}_{P_t^\circ} - \bar{F}_{L_t^\circ} = F_{P_t^\circ} - F_{L_t^\circ}$  stellt dies jedoch kein Problem dar.

Der Term  $F_{\text{lin}}$  ist der Hintergrund, der an den Stellen  $\phi_L = 0$  und  $\phi_L = 1$  die Werte  $\bar{F}_{P_t^\circ}$  bzw.  $\bar{F}_{L_t^\circ}$  annimmt. D. h. dass der Hintergrund der Messung nicht separat bestimmt werden muss, sondern implizit über die Messung der Intensitäten bei  $\phi_L = 0$  und  $\phi_L = 1$  bestimmt werden kann.

Die Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes für  $n = 1$  erhalten wir, wenn wir (9.12) in (8.2) einsetzen und umstellen:

$$[\text{PL}] = \frac{1}{2} \left( \phi_L (L_t^\circ - P_t^\circ) + P_t^\circ + K_D - \sqrt{(\phi_L (L_t^\circ - P_t^\circ) + P_t^\circ + K_D)^2 - 4 P_t^\circ L_t^\circ \phi_L (1 - \phi_L)} \right) \quad (9.14)$$

Wird der Hintergrund  $F_{\text{lin}}$  von  $F$  subtrahiert, so erhalten wir mit (9.14) nach Umstellen:

$$\Delta F = F - F_{\text{lin}} = \frac{\delta}{2} \left( \phi_L (L_t^\circ - P_t^\circ) + P_t^\circ + K_D - \sqrt{(\phi_L (L_t^\circ - P_t^\circ) + P_t^\circ + K_D)^2 - 4 P_t^\circ L_t^\circ \phi_L (1 - \phi_L)} \right) \quad (9.15)$$

Das ist unser Modell zur Ermittlung der  $K_D$  über die Methode der kontinuierlichen Variation für  $n = 1$ .

### 9.2.2. Gleichzeitige Bestimmung der Dissoziationskonstante und des stöchiometrischen Koeffizienten – die implizite CVM

Wollen wir nicht nur die Dissoziationskonstante, sondern auch den stöchiometrischen Koeffizienten  $n$  ermitteln – was ja der ursprüngliche Zweck der Methode der kontinuierlichen Variation war –, so können wir nicht auf den Trick aus (8.4) bzw. (8.5) zurück greifen. Hier müssen wir die implizite Funktion (8.3) nutzen. Setzen wir (9.12) in (8.3) ein, so

erhalten wir:

$$0 = \left( \frac{P_t^\circ (1 - \phi_L)}{[PL_n]} - 1 \right) (L_t^\circ \phi_L - n [PL_n])^n - K_D \quad (9.16)$$

Wir nutzen nun aus das  $\Delta F = \delta [PL_n]$  ist und ersetzen  $[PL_n]$ :

$$0 = \left( \frac{\delta P_t^\circ (1 - \phi_L)}{\Delta F} - 1 \right) \left( L_t^\circ \phi_L - \frac{n \Delta F}{\delta} \right)^n - K_D \quad (9.17)$$

Zur Schätzung der Dissoziationskonstante  $K_D$ , des Proportionalitätsfaktors  $\delta$  und des stöchiometrischen Faktors  $n$  mittels dieses Modells benötigen wir ein spezielles Regressionsverfahren das als Orthogonale Distanzregression bekannt ist [86, 21].

### 9.2.3. Normierung der CVM-Fluoreszenzintensität

Da wir keine absoluten Intensitäten mit der Fluoreszenz messen können, wollen wir die Intensitäten einer CVM-Titration normieren, um später eine Mittelung wiederholter CVM-Messungen berechnen zu können. Dazu verwenden wir folgenden Formel:

$$F_{\text{norm}} = 100 \left( \frac{F(\phi_L) - F(\phi_L = 1)}{F(\phi_L = 0) - F(\phi_L = 1)} \right) \quad (9.18)$$

Die Intensitäten  $F(\phi_L = 1)$  bzw.  $F(\phi_L = 0)$  sind die Intensitäten bei  $\phi_L = 1$  bzw. 0.  $F(\phi_L)$  ist die Intensität und  $F_{\text{norm}}$  die normierte Intensität. Aus der normierten Intensität  $F_{\text{norm}}$  wird dann die reduzierte Intensität  $\Delta F_{\text{norm}}$  gebildet, die dann für die Gleichungen (9.15) bzw. (9.17) verwendet wird:

$$\Delta F_{\text{norm}} = F_{\text{norm}} - 100 (1 - \phi_L) \quad (9.19)$$

Diese Art der Normierung funktioniert nur dann gut, wenn die Differenz zwischen  $F(\phi_L = 1)$  und  $F(\phi_L = 0)$  groß ist. Sollte dies nicht der Fall sein, so bilden wir den aus den gemessenen Intensitäten den Median und nehmen an, dass sich die Mediane wiederholter CVM-Titrationen nur zufällig unterscheiden würden. Wir normieren dann die Rohdaten so, dass für alle Datensätze der Median gleich groß wird.

### 9.2.4. Adsorption von Protein

Für die CVM wird die Konzentration des Proteins linear über einen großen Bereich variiert (in dieser Arbeit von  $10 \mu\text{M}$  bis auf  $1 \mu\text{M}$ ). Diese Linearität wird gestört, wenn Proteinadsorptionseffekte eine Rolle spielen. Dabei wird die aktuelle Proteinkonzentration

on  $P_t$  um die adsorbierte Proteinkonzentration  $P_{\text{ads}}$  reduziert:

$$P_t = P_t^\circ (1 - \phi_L) - P_{\text{ads}} \quad (9.20)$$

Hierbei kann  $P_{\text{ads}}$  auch selbst wieder von  $\phi_L$  abhängen. Gehen wir davon aus, dass sich zwischen freiem und adsorbierten Protein und dem Adsorbens A ein Gleichgewicht  $P + A \rightleftharpoons P_{\text{ads}}$  einstellt, so kann  $P_{\text{ads}}$  analog zur *Langmuir'schen Adsorptionsisotherme* berechnet werden [2]. Wir kennen allerdings nicht die Stärke der Bindung des Proteins an das Adsorbens, noch die Geschwindigkeit der Einstellung des Gleichgewichtszustandes. Daher gehen wir vereinfachend davon aus, dass die Affinität bzw. die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung unendlich hoch sei. Da wir Plastikmaterial mit explizit angegebener geringer Adsorptionsfähigkeit verwenden, können wir auch annehmen, dass die adsorbierte Proteinkonzentration  $P_{\text{ads}}$  klein sei.

Wegen der angenommenen unendlich hohe Affinität bzw. unendlich schnellen Einstellung des Gleichgewichtszustandes für die Adsorption, ist die adsorbierte Proteinkonzentration für die CVM konstant, sobald  $P_t > P_{\text{ads}}$  ist. Ist  $P_t \leq P_{\text{ads}}$  wird das Protein komplett adsorbiert. Der Umschlag findet bei  $\phi_{L,0} = (1 - P_{\text{ads}}/P_t^\circ)$  statt. Die aktuelle totale Proteinkonzentration berechnet sich dann als:

$$P_t = \begin{cases} P_t^\circ (1 - \phi_L) - P_{\text{ads}} & \text{für } \phi_L < \left(1 - \frac{P_{\text{ads}}}{P_t^\circ}\right) \\ 0 & \text{für } \phi_L \geq \left(1 - \frac{P_{\text{ads}}}{P_t^\circ}\right) \end{cases} \quad (9.21)$$

### 9.3. Fluoreszenzlöschung

Die Löschung der Fluoreszenzintensität (Quenching) bedeutet die Verringerung der gemessenen Intensität durch die Zugabe von speziellen Molekülen (Quenchern). Es werden dabei zwei grundlegende Mechanismen für das Quenching angenommen [72]: (i) das *dynamische Quenching*, bei dem die Energie des angeregten Fluorophors quasi durch Stoß strahlungslos auf den Quencher übergeht, (ii) das *statische Quenching*, bei dem das Fluorophor und der Quencher einen Komplex bilden, der entweder nicht mehr fluoresziert oder bei dem die Emission so stark rotverschoben ist, dass sie bei der ursprünglichen Wellenlänge nicht mehr detektiert werden kann.

Zwischen dem Quenching der Fluoreszenz und der Konzentration des Quenchers  $Q$  stellt die Stern-Volmer-Gleichung folgenden Zusammenhang her [72, 111]:

$$\frac{F_0}{F} - 1 = K_{\text{SV}} Q \quad (9.22)$$

## Einleitung

Dabei ist  $F$  die Fluoreszenzintensität,  $F_0$  die anfängliche gemessene Fluoreszenzintensität in Abwesenheit des Quenchers,  $Q$  die Konzentration des Quenchers und  $K_{SV}$  ist die Stern-Volmer-Konstante. Für den Fall des dynamischen Quenchings kann die  $K_{SV}$  eine Auskunft über die Zugänglichkeit des Fluorophors zum umgebenen Medium liefern. In unserem Fall ist dies die Zugänglichkeit des an der Bindung mit beteiligten Tryptophans der EVH1-Domäne, was uns Auskunft über die Bindung gibt.

Da wir sparsam mit dem Protein umgehen wollen, d. h. mit einem kleinen Volumen arbeiten, und die Konzentration der Quencherlösung nicht beliebig hoch sein kann, müssen wir den Verdünnungseffekt mit in die Stern-Volmer-Gleichung einbeziehen. Dabei lauten die Abhängigkeit der totalen Konzentration des Fluorophors  $F$  und des Quenchers  $Q$ :

$$\begin{aligned} F_t &= F_t^\circ \frac{V_0}{V_0 + \Delta V} \\ Q_t &= Q_t^\circ \frac{\Delta V}{V_0 + \Delta V} \end{aligned} \quad (9.23)$$

Hier ist  $V_0$  das Anfangsvolumen in der Küvette und  $\Delta V$  das kumulierte titrierte Volumen nach (9.4). Die Konzentrationen  $F_t^\circ$  und  $Q_t^\circ$  sind die Anfangskonzentration des Fluorophors in der Küvette bzw. der zu titrierenden Quencherlösung.

Wir stellen die Stern-Volmer-Gleichung nach  $F$  um und erhalten die Darstellung für die gemessene Fluoreszenzintensität, wobei in unserem Fall  $F_0$ , als auch  $Q_t$  von  $\Delta V$  abhängen:

$$F = F_0(\Delta V) \frac{1}{K_{SV} Q_t(\Delta V) + 1} \quad (9.24)$$

Die Intensität  $F_0$  des ungestörten Fluorophors ist proportional zu seiner Konzentration (siehe auch (9.2)), wobei die Konzentration des Fluorophors mit (9.23) ersetzt wird:

$$F_0 = \alpha F_t = \overbrace{\alpha F_t^\circ}^{=F_{00}} \frac{V_0}{V_0 + \Delta V} \quad (9.25)$$

Die Intensität  $F_{00} = \alpha F_t^\circ$  entspricht der unverdünnten Fluoreszenzintensität, wenn noch kein Quencher zur Lösung gegeben wurde. Wir ersetzen nun  $F_0$  bzw.  $Q_t$  in (9.24) mit (9.25) bzw. (9.23) und erhalten nach umstellen:

$$\frac{F_{00}}{F} - 1 = \frac{\Delta V}{V_0} (K_{SV} Q_t^\circ + 1) \quad (9.26)$$

Auftragen des linken Terms gegen  $\Delta V$  ergibt dann den Stern-Volmer-Plot unter Berücksichtigung der Verdünnung des Fluorophors. Unter Verwendung des Regressionsmodells  $y = mx + n$  kann dann der Anstieg  $m$  und damit – und unter Verwendung von

$K_{SV} = (m V_0 - 1)/Q_t^\circ$  – die Stern-Volmer-Konstante  $K_{SV}$  berechnet werden.

## 9.4. Filtereffekte

Der angenommene lineare Zusammenhang für die Einzelintensitäten in (9.2) gilt nur für ausreichend verdünnte Lösungen. Die dahinter steckende Annahme ist die, dass die Absorption von Anregungs- und Emissionslicht vernachlässigt werden kann. Mit zunehmender Konzentration der Fluorophore verringert die Absorption von Anregungs- und Emissionslicht das gemessene Fluoreszenzsignal und der lineare Zusammenhang zwischen Konzentration und gemessener Fluoreszenzintensität ist nicht mehr gültig. Dieser Effekt heißt Filtereffekt (auch inner filter effect), wobei zwischen dem ersten (Absorption des Anregungslichtes) und zweiten (Absorption des Emissionslichtes) Filtereffekt unterschieden wird [72].

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz –  $A = d \epsilon_\lambda c$  – kann der Filtereffekt durch folgende drei Maßnahmen minimiert werden: (i) Verringerung der Schichtdicke  $d$ , (ii) Auswahl einer Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge mit kleinem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_\lambda$  (z. B. durch Verlegung der Anregung in den roten Bereich des Absorptionsspektrums), (iii) Verringerung der Konzentration der Fluorophore. Aber gerade letzteres ist bei einer Titration nicht immer möglich.

Ein anderer Zugang ist die Rückrechnung auf einen linearen Verlauf der Intensität  $F_{lin}$  aus der gemessenen Intensität  $F_{obs}$  unter Einbeziehung eines Korrekturfaktors  $C$ :

$$F_{lin} = C F_{obs} \quad (9.27)$$

Für den Korrekturfaktor sind verschiedene Ansätze bekannt, je nach dem wie stark der Filtereffekt ist [72, 34, 77, 23, 20]. Da die Herleitung von  $C$  sehr umfangreich ist und der Korrektur des Filtereffektes in dieser Arbeit nur ein kleiner Raum eingeräumt wird, wollen wir hier darauf verzichten und verweisen besonders auf die sehr detaillierte Arbeit von MacDonald et al. [77].

Für kleine Absorptionen  $A_{ex}$  und  $A_{em}$  für das Extinktions- und Emissionslicht kann für den Korrekturfaktor folgende Gleichung verwendet werden [20, 77]:

$$C = \frac{2,303 A_{ex}}{1 - 10^{-A_{ex}}} \cdot \frac{2,303 A_{em}}{1 - 10^{-A_{em}}} \quad (9.28)$$

Für den Fall, dass die Absorption  $A_{em}$  des Emissionslichts vernachlässigt werden kann,

## *Einleitung*

vereinfacht sich diese Gleichung auf:

$$C = \frac{2,303 A_{\text{ex}}}{1 - 10^{-A_{\text{ex}}}} \quad (9.29)$$



# 10. Isotherme Titrationskalorimetrie

Ein isothermes Titrationskalorimeter ist ein isobares Kalorimeter mit dem die Reaktionsenthalpie, die Dissoziationskonstante (sofern es sich um eine reversible Reaktion handelt), als auch die Stöchiometrie einer Reaktion bei einer festen Temperatur bestimmt werden kann. Dabei wird in eine Messzelle mit dem Reaktanten der Titrant über eine Spritze injiziert und vermischt, und dabei die Wärmeabgabe oder -aufnahme gemessen. In unserem Fall ist der Reaktant im allgemeinen ein Protein und der Titrant ein peptidischer Ligand. Die bei jeder  $i$ ten Injektion abgegebene oder aufgenommene Wärmemenge  $Q_i$  ist proportional zur Menge an gebildetem Protein-Ligand-Komplex je  $i$ ter Injektion. Da das isotherme Titrationskalorimeter bei konstanten Druck arbeitet und keine Volumenarbeit geleistet wird, ist die gemessene Wärmemenge  $Q_i$  gleich der Reaktionsenthalpie. Verwenden wir die molare Reaktionsenthalpie  $\Delta H$  zur Angabe der Wärmemenge der Entstehung von einem Mol Protein-Ligand-Komplex, so kann die Wärmemenge  $Q_i$  für die  $i$ te Injektion geschrieben werden als:

$$Q_i = V_0 \Delta H \Delta[\text{PL}]_i = V_0 \Delta H \left( [\text{PL}]_i - [\text{PL}]_{(i-1)} \right) \quad (10.1)$$

Dabei ist  $\Delta[\text{PL}]_i$  die Änderung in der Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes von der  $(i - 1)$ ten zur  $i$ ten Injektion, und  $V_0$  ist das Volumen der Messzelle.

Bei der Injektion von Ligandenvolumen in die Messzelle kommt es zur Verdünnung der totalen Konzentration von Protein und Ligand, wobei sich das Verdünnungsproblem hier komplexer als bei der FT darstellt. So kommt es bei der Injektion von Ligand in die Messzelle zu keiner homogenen Durchmischung des gesamten Lösungsmittelvolumens. Gleichzeitig ist nur der Teil der Lösung messbar, der sich in der Messkammer befindet. Im Titrationskalorimeter ist die Messzelle mit einer dünnen Verbindungsrohre versehen, über die die Messzelle befüllt und der Ligand injiziert wird. Die Injektion von Ligandlösung drückt einen Teil der Lösung aus der Messzelle in die Verbindungsrohre, wo es weder mit der restlichen Lösung in der Messzelle vermischt wird, noch zum Messsignal beiträgt. Die Behandlung dieses Problems ist in der Literatur uneinheitlich gelöst. So ist dem Autor die Darstellung nach MicroCal [82] und die nach Velazquez-Campoy et al. [116, 115] bekannt. Wir wollen nachfolgend aber nur die Darstellung von MicroCal zeigen, da wir

sie zur Auswertung in den von uns geschriebenen R-Skripten verwenden werden.

## 10.1. Die Lösung des Verdünnungsproblem nach MicroCal

Die Messlösung steht in der Messzelle und in der Verbindungsröhre, über die die Zelle befüllt und die Injektionen durchgeführt werden. In die Messzelle wird langsam die Ligandlösung injiziert, wobei gleichzeitig gerührt und ein Teil des Messzellvolumens in die Verbindungsröhre gedrückt wird. Dabei wirkt das Gerät wie ein linearer Gradientenmischer. Die Menge an Protein in der Messzelle und in der Verbindungsröhre bleibt natürlich konstant. Es interessiert aber nur die Verdünnung der anfänglichen Menge  $V_0 \times P_t^\circ$  an Protein in der Messzelle, da die Proteinlösung in der Verbindungsröhre nicht zum Messsignal beiträgt. Wegen der Erhaltung der Masse läßt sich folgender Zusammenhang aufstellen:

$$V_0 P_t^\circ = V_0 P_t + \frac{1}{2} (P_t^\circ + P_t) \Delta V \quad (10.2)$$

Der Term auf der linken Seite der Gleichung ist die anfängliche Menge an Protein in der Messzelle, mit  $P_t^\circ$  der anfänglichen Konzentration des Proteins. Der erste Summand des Terms auf der rechten Seite der Gleichung ist die aktuelle Menge an Protein in der Messzelle, der zweite Summand ist die aktuelle Menge an Protein in der Verbindungsröhre, wobei  $P_t$  ist die aktuelle Proteinkonzentration und  $\Delta V$  das kumulierte Ligandenvolumen wie in (9.4) ist. Da das Gerät wie ein linearer Gradientemischer wirkt, nimmt die Konzentration an Protein innerhalb der Röhre von  $P_t^\circ$  nach  $P_t$  linear ab. D. h. die Konzentration an Protein in der Verbindungsröhre ist das Mittel von  $P_t^\circ$  und  $P_t$ , und mithin auch die Menge an Protein. Umstellen von (10.2) nach  $P_t$  führt zu:

$$P_t = P_t^\circ \left( \frac{1 - \frac{\Delta V}{2V_0}}{1 + \frac{\Delta V}{2V_0}} \right) \quad (10.3)$$

Die Herleitung der Verdünnung des Liganden verläuft analog zur Verdünnung des Proteins. Auch hier wirkt das Gerät bei der Injektion von Ligand wieder als linearer Gradientenmischer. Da anfänglich natürlich kein Ligand in der Zelle vorhanden ist, steigt die Konzentration des Liganden mit der Injektion von Ligandenvolumen in der Verbindungsröhre linear an. Die Menge an Ligand in Messzelle und Verbindungsröhre entspricht derselben Menge an Ligand, wenn die injizierte Ligandlösung nur im Volumen der Messzelle vorhanden wäre. Ähnlich zu (10.3) kann für den Liganden dann folgender Zusammenhang geschrieben werden:

$$V_0 \bar{L}_t^\circ = V_0 L_t + \frac{L_t}{2} \Delta V \quad (10.4)$$

## Einleitung

Dabei ist  $\bar{L}_t^\circ = L_t^\circ \Delta V/V_0$  die Konzentration des injizierten Liganden in der Messzelle, würde die Injektion das Gesamtvolumen in Messzelle und Röhre nicht erhöhen. Umstellen von (10.4) nach  $L_t$  und Ersetzen von  $\bar{L}_t^\circ$  ergibt dann:

$$L_t = L_t^\circ \frac{\Delta V}{V_0} \left(1 - \frac{\Delta V}{2V_0}\right) \quad (10.5)$$

Die Gleichungen (10.3) und (10.5) können nun in (8.2) eingesetzt werden um die Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes zu berechnen. Jedoch wird meist die Gleichung (8.4) (oder (8.5)) bevorzugt, so dass wir mit der ITC prinzipiell den stöchiometrischen Koeffizienten ermitteln können. Es sei aber noch einmal daran erinnert, dass die Ermittlung des stöchiometrischen Koeffizienten voraussetzt, dass die anfänglichen totalen Konzentration des Proteins  $P_t^\circ$  und des Liganden  $L_t^\circ$  genau genug bekannt sind.

Da wir nun die Konzentration von [PL] berechnen können, können wir mit (10.1) die Wärmemenge  $Q_i$  der  $i$ ten Injektion berechnen. Allerdings sind dabei zwei Dinge zu berücksichtigen: (i) die Konzentration  $[PL]_{(i-1)}$  verdünnt sich durch die  $i$ te Injektion vergleichbar zur Verdünnung von  $P_t$  wie in (10.3) dargelegt, (ii) geht MicroCal davon aus, dass die Reaktion und die Vermischung der Reaktionspartner schnell abläuft, und daher ein Teil des injizierten Volumens (etwa die Hälfte) zur gemessenen Wärmemenge beiträgt, bevor das entsprechende Volumen in der Verbindungsrohre verschwindet. Die gemessene Wärmemenge  $Q_i$  erhöht sich deswegen um einen Faktor von  $[1 + dV_i/(2V_0)]$ . Zusammengefasst errechnet sich die Wärmemenge  $Q_i$  der  $i$ ten Injektion nach MicroCal:

$$Q_i = \Delta H \left( [PL]_i \left( V_0 + \frac{dV_i}{2} \right) - [PL]_{(i-1)} \left( V_0 - \frac{dV_i}{2} \right) \right) \quad (10.6)$$

## 10.2. Verdünnungswärme

Bisher wurde davon ausgegangen, dass die gemessene Wärmemenge  $Q_i$  allein durch die Bindung von Ligand an das Protein bestimmt würde. Es sind aber natürlich noch andere Prozesse denkbar, die zur gemessenen Wärmemenge  $Q_i$  beitragen. Im einfachsten Fall ist  $Q_i$  eine Summe aus der Wärmemenge der Bindung des Liganden  $Q_{[PL],i}$  und einer konstanten Verdünnungswärme  $Q_{\text{dil}}$ , die bei der Injektion des Liganden in die Lösung der Messzelle entsteht:

$$Q_i = Q_{[PL],i} + Q_{\text{dil}} \quad (10.7)$$

Selbstverständlich sind noch andere weit komplexere Situationen denkbar. So kann die Verdünnungswärme nicht konstant über die Injektionen des Liganden sein, wenn bpsw. ein Unterschied in der Ionenstärke oder im pH zwischen der Protein- und der Ligand-

lösung auftritt, oder der Ligand in assoziierter Form vorliegt [116]. Allerdings bedürfen alle nicht konstanten Wärmemengen, die nicht zur Bindungswärme  $Q_{[\text{PL}],i}$  gehören, einer separaten Bestimmung, um sie dann von  $Q_i$  zu subtrahieren. Die konstante Verdünnungswärme  $Q_{\text{dil}}$  dagegen kann direkt in der nichtlinearen Regression ermittelt werden, mit der auch die Reaktionsenthalpie  $\Delta H$ , die Dissoziationskonstante  $K_D$  und der stöchiometrische Koeffizient  $N$  oder  $M$  geschätzt werden.

Da die Injektionsvolumina  $dV_i$  nicht konstant sein müssen, beschreiben wir die Verdünnungswärme jeder  $i$ ten Injektion als die „Verdünnung“ einer hypothetisch in der Spritze enthaltenen Gesamtverdünnungswärme  $Q_{\text{dil}}^\circ$  bzw. pro Volumeneinheit enthaltenen Verdünnungswärme  $\bar{Q}_{\text{dil}}$  (quasi eine Wärmekonzentration):

$$Q_{\text{dil}} = Q_{\text{dil}}^\circ \frac{dV_i}{V_0} = \bar{Q}_{\text{dil}} dV_i \quad (10.8)$$

### 10.3. Normierung der Einzelwärmern

Obwohl für den Datenfit nicht notwendig, werden die Einzelwärmern  $Q_i$  mit der Menge an injiziertem Liganden normiert dargestellt [82]:

$$Q_{i,\text{norm}} = \frac{Q_i}{dV_i L_t^\circ} \quad (10.9)$$

Die normierten Wärmern entsprechen dann einer Wärmemenge pro Mol (meist als kJ/mol), ebenso wie die Reaktionsenthalpie  $\Delta H$ , die freie Reaktionsenthalpie  $\Delta G^\circ$  und die entropische Energie  $-T \Delta S$ .

Wird als Regressionmodell (8.5) verwendet, so muss die Konzentration  $L_t^\circ$  mit dem, in der Regression bestimmten Wert von  $M$ , multipliziert werden:

$$Q_{i,\text{norm}} = \frac{Q_i}{dV_i M L_t^\circ} \quad (10.10)$$

Die Verdünnungswärme wird ebenso wie  $Q_i$  normiert, jedoch wird bei Verwendung von  $\bar{Q}_{\text{dil}}$  aus (10.8) die Normierung unabhängig von den Injektionsvolumina  $dV_i$ :

$$Q_{\text{dil},\text{norm}} = \frac{Q_{\text{dil}}}{dV_i L_t^\circ} = \frac{\bar{Q}_{\text{dil}}}{L_t^\circ} \quad (10.11)$$

Bei Verwendung des Regressionsmodells (8.5) wird die Konzentration des Liganden in

der Spritze  $L_t^\circ$  mit dem Wert für  $M$  multipliziert:

$$Q_{\text{dil, norm}} = \frac{Q_{\text{dil}}}{dV_i M L_t^\circ} = \frac{\bar{Q}_{\text{dil}}}{M L_t^\circ} \quad (10.12)$$

## 10.4. Bestimmung der freien Enthalpie und der entropischen Energie

Mittels isothermer Titrationskalorimetrie kann die Reaktionsenthalpie  $\Delta H$ , die Dissoziationskonstante  $K_D$  der Reaktion (7.1) und, über die Beziehung (7.6), ausserdem die freie Reaktionsenthalpie  $\Delta G^\circ$  bestimmt werden. Mit  $\Delta G^\circ$  und der Reaktionsenthalpie  $\Delta H$  kann dann mit (7.10) die entropische Energie  $-T \Delta S$ , bzw. die Reaktionsentropie  $\Delta S$  berechnet werden:

$$-T \Delta S = \Delta G^\circ - \Delta H = RT \ln \left( \frac{K_D}{1 \text{ M}} \right) - \Delta H \quad (10.13)$$

Damit sind die Werte für  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta S$  bzw.  $-T \Delta S$  aus den freibestimmbaren Regressionsparametern abgeleitete Werte.

## 10.5. Ermittlung der Umwandlungsgeschwindigkeit des Liganden einer nichtbindenden zu einer bindenden Konformation mittels ITC

Der Ligand liege in zwei Populationen vor: einer bindenden nativen Population  $L^n$  und einer nichtbindenden Population  $L^u$ . Nur die bindende Komponente bildet mit dem Protein einen Komplex. Die dazugehörige Reaktionsgleichung lautet dann:



Wir nehmen nun an, dass  $L^n$  *vollständig* an das Protein binde. D. h. die Dissoziationskonstante des Protein-Ligand-Komplexes sei sehr klein und/oder das Protein liege im sehr hohen Überschuß vor. Zusätzlich nehmen wir an, dass die Einstellung des Gleichgewichtes für den Protein-Ligand-Komplex sehr viel schneller, als die Einstellung des Gleichgewichtes der Ligandkonformation ablaufe. Die Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes entspreche also zu jedem Zeitpunkt der Gleichgewichtskonzentration. Die Reaktionsglei-

## Einleitung

chung (10.14) vereinfacht sich dann zu:



Hierbei ist  $k$  die Umfaltungsgeschwindigkeit von der nichtbindenden zur bindenden Konformation. Da  $L^n$  stets vollständig und instantan an das Protein bindet, ist seine freie Konzentration stets null und es gilt zusätzlich für die totale Konzentration des Liganden:

$$L_t = L^u + PL^n \quad (10.16)$$

Die Zeitabhängigkeit der Konzentration von  $L^u$  für die Reaktion (10.15) entnehmen wir [2], wobei  $L_0^u$  die Konzentration von  $L^u$  zum Zeitpunkt  $t = 0$  ist:

$$L^u(t) = L_0^u \exp[-k t] \quad (10.17)$$

In der ITC wird die aktuelle Wärmemenge  $Q$  durch Integration der zeitabhängigen Heizleistung  $q$  abzüglich eines ebenfalls zeitabhängigen Hintergrundes  $q_0$  (d. h. der ungestörten Heizleistung) über ein Zeitintervall  $\Delta t = t_2 - t_1$  gebildet:

$$Q = \int_{t_1}^{t_2} (q - q_0) dt \quad (10.18)$$

Die Ableitung dieses Integrals nach der Zeit für infinitesimal kleine Zeitintervalle  $\Delta t \rightarrow dt$  ergibt nach umstellen für die Heizleistung  $q$ :

$$q = \frac{dQ}{dt} + q_0 \quad (10.19)$$

Die Änderung der Wärmemenge bzw. der Enthalpie mit der Zeit lässt sich entsprechend nach (10.1) proportional zur Änderung der Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes und des nichtbindenden Liganden mit der Zeit darstellen. Hierbei nutzen wir die Additivität der Enthalpie aus.:

$$q = V_0 \left( \Delta H_{PL^n} \frac{dPL^n}{dt} + \Delta H_{L^u} \frac{dL^u}{dt} \right) + q_0 \quad (10.20)$$

Dabei sind  $\Delta H_{PL^n}$  und  $\Delta H_{L^u}$  die molaren Reaktionsenthalpien pro Formelumsatz für die Bildung des Protein-Ligand-Komplex und die Umwandlung des Liganden von  $L^u$  nach

## Einleitung

$L^n$ . Mit (10.16) können wir die Protein-Ligand-Konzentration ersetzen:

$$q = V_0 \left( \Delta H_{\text{PL}^n} \frac{d(L_t - L^u)}{dt} + \Delta H_{L^u} \frac{dL^u}{dt} \right) + q_0 \quad (10.21)$$

Wir ersetzen  $L^u$  mit (10.17), differenzieren und erhalten letztlich für die zeitliche Änderung der Heizleistung nach Injektion und vollständiger Vermischung des Liganden mit der Proteinlösung:

$$\begin{aligned} q &= V_0 L_0^u k (\Delta H_{\text{PL}^n} - \Delta H_{L^u}) \exp[-k t] + q_0 \\ &= A \exp[-k t] + q_0 \end{aligned} \quad (10.22)$$

Wir können damit aus einem entsprechenden Datensatz über nichtlineare Regression die Umwandlungsgeschwindigkeit  $k$  vom nichtbindenden zum bindenden Liganden bestimmen. Dabei ist der Hintergrund  $q_0$  nicht notwendigerweise zeitlich konstant. Aus  $k$  können wir dann auch die Halbwertszeit berechnen:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (10.23)$$



# 11. Statistik

In diesem Kapitel werden die verwendeten Mittel und Formeln zur Behandlung der in dieser Arbeit auftretenden statistischen Probleme vorgestellt. Diese ergeben sich größtenteils aus der notwendigen Regression der Daten mit den entsprechenden Modellen, um daraus dann die interessierenden Parameter zu berechnen. Da wir aber auch an der *statistisch signifikanten* Änderung in der Affinität unserer Liganden gegenüber einer Referenz interessiert sind, wird ebenfalls der dazugehörige Test vorgestellt.

Ein Datenfit sollte nach dem Kapitel 15 *Modeling of Data* der *Numerical Recipes* von Press et al. [94] folgende drei Dinge liefern:

- (i) Die angepassten Parameter,
- (ii) Schätzungen für die Messunsicherheit dieser Parameter und
- (iii) eine statistische Angabe über die Güte des Datenfits.

Von Press et al. wird eine Warnung ausgesprochen<sup>1</sup>, sollte sich nicht an diese Regel gehalten werden. Wir hören diese Warnung sehr wohl und nehmen sie ernst. Daher wird im Nachfolgenden die Behandlung dieser drei Punkte innerhalb dieser Arbeit dargestellt, d. h. die verwendeten Regressionstypen, die Art der Bestimmung der Messunsicherheiten bzw. Konfidenzintervalle und die verwendeten Maße für die Güte des Datenfits. Für die Auswertungen wurden Skripte in R [95] und in modernem Fortran ( $\geq$  Fortran90) geschrieben.

## 11.1. Regressionen

Die Regressionen für die Fluoreszenztitration, die Methode der kontinuierlichen Variation und der isothermen Titrationskalorimetrie wurden mit den in dieser Arbeit dargestellten Modellen und der Funktion `nls` der Sprache R (FT, explizite CVM, ITC) [95] bzw. dem Paket `ODRPack` (implizite CVM) [21] durchgeführt.

---

<sup>1</sup>*Unfortunately, many practitioners of parameter estimation never proceed beyond item (i). They deem a fit acceptable if a graph of data and model “looks good”. This approach is known as chi-by-eye. Luckily, its practitioners get what they deserve. [94]*

Wir werden zuerst auf den Unterschied zwischen der gewöhnlichen Methode der kleinsten Quadrate (ordinary least square; OLS) zur orthogonalen Distanzregression (ODR) eingehen, dann auf den Unterschied der ungewichteten zur gewichteten Regression, die Bestimmung von Ausreißern und die verwendeten Regressionstypen zur simultanen Auswertung multipler Datensätze für die ITC.

### 11.1.1. OLS vs. ODR

Im allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die Fehler bzw. Unterschiede zwischen der modellierten Funktion und den tatsächlichen Daten allein für die abhängige Variable  $y$  (auch Antwortvariable genannt) auftritt. D. h. der Fehler der unabhängigen Variable  $x$  (auch erklärende Variable oder Regressor genannt) sei vernachlässigbar. Dieses Modell wird auch als *fixed-regressor model* bezeichnet [86]. Es lässt sich allgemein schreiben als:

$$y_i = f(x_i, \boldsymbol{\theta}) + \epsilon_i \quad (11.1)$$

Dabei ist die Funktion  $f(x_i, \boldsymbol{\theta})$  die Modellfunktion (auch Erwartungsfunktion genannt),  $\boldsymbol{\theta}$  der Vektor der zu fittenden Parameter und  $\epsilon_i$  ist der  $i$ te Störungsterm zwischen Modellfunktion und dem gemessenen Wert  $y_i$ . Das mit dem Regressionsmodell verbundene Minimierungsproblem wird meist formuliert als [86, 21]:

$$\min_{\boldsymbol{\theta}, \epsilon} \sum_{i=1}^n \epsilon_i^2 \quad (11.2)$$

Regressionsmodell und Minimierungsproblem werden für den nichtlinearen Fall – d. h. die Modellfunktion  $f(x_i, \boldsymbol{\theta})$  ist keine lineare Kombination der Parameter  $\boldsymbol{\theta}$  – auch als *Ordinary Least Square*-Regression bezeichnet. Diese Regression kommt mit gewissen Annahmen daher [15, 86]:

- (i) die Modellfunktion ist korrekt oder zumindest plausibel,
- (ii) die Annahme eines *fixed-regressor model* ist plausibel,
- (iii) der Störungsterm  $\epsilon_i$  ist unabhängig von der Modellfunktion (siehe (i)),
- (iv) der Störungsterm ist normalverteilt (das ergibt sich aus der Art des gestellten Minimierungsproblems; andere Minimierungsprobleme stellen andere Anforderungen an die Verteilung des Störungsterms),
- (v) die Verteilung des Störungsterms hat einen Mittelwert von null (das geht Hand in Hand mit der Annahme (i)),

(vi) alle Störungsterme haben die gleiche Varianz und

(vii) die Störungsterme sind unabhängig verteilt.

Die Voraussetzungen (iii) bis (vii) untersuchen wir mittels einer Auftragung der studentisierten Reste gegen die erklärende Variable (siehe auch den Abschnitt *Ausreißer* auf Seite 72) und speziell die Anforderung (iv) mittels des Anderson-Darling-Test [104].

Sind die Fehler in der erklärenden Variable  $x$  nicht vernachlässigbar, dann haben wir es mit einem *errors-in-variables model* zu tun [86], welches sich allgemein schreiben lässt als:

$$y_i = f(x_i + \delta_i, \boldsymbol{\theta}) + \epsilon_i \quad (11.3)$$

Im Prinzip sind alle in dieser Arbeit verwendeten Titrationsmodelle *errors-in-variables models*, da durch die Injektion des Ligandvolumens für die FT und für die ITC, bzw. durch die Vermischung von Protein- und Ligandlösung für die CVM, Fehler für das akkumulierte Volumen  $\Delta V$ , bzw. das Injektionsvolumen  $dV_i$ , oder den Volumenanteil  $\phi_L$  der Ligandlösung auftreten. Wir nehmen jedoch an, dass der Störungsterm  $\delta_i$  stets vernachlässigbar sei <sup>2</sup>. Das mit dem Regressionsmodell verbundene Minimierungsproblem wird meist formuliert als [86, 21]:

$$\min_{\boldsymbol{\theta}, \epsilon, \delta} \sum_{i=1}^n (\epsilon_i^2 + \delta_i^2) \quad (11.4)$$

Regressionsmodell und Minimierungsproblem werden für den nichtlinearen Fall auch als *Orthogonal Distance Regression* bzw. orthogonale Distanzregression (ODR) bezeichnet [86]. Für die ODR gelten die gleichen Bedingungen wie für die OLS, dabei gelten zusätzlich die gleichen Bedingungen für die Störungsterme  $\delta_i$  wie für  $\epsilon_i$ .

Der Vorteil der ODR ist die Möglichkeit implizite Funktionen wie (9.17) zu fitten: Bei der OLS sind für den impliziten Fall der Definition nach keine Störungsterme  $\epsilon_i$  mehr vorhanden. Dies gilt zwar auch für die (explizite) ODR, jedoch verbleiben die Störungsterme  $\delta_i$ :

$$0 = f(x_i + \delta_i, \boldsymbol{\theta}) \quad (11.5)$$

Diese Art der Regression wird auch als implizite ODR bezeichnet [21]. Das Minimierungsproblem stellt sich analog zur OLS, jedoch ist zu beachten, dass wir jetzt zwei

---

<sup>2</sup>Man beachte dabei, dass bspw. für die FT der Fehler für das kumulierte Ligandvolumen lautet:  $u_c(\Delta V) = \sqrt{n} \times u_c(dV_i)$ . D. h. die Messunsicherheit des kumulierten Ligandvolumens  $u_c(\Delta V)$  für die  $n$ te Injektion nimmt mit der Wurzel aus  $n$  zu. Dabei ist  $u_c(dV_i)$  die Messunsicherheit des (konstanten) Volumens einer Einzelinjektion.

unabhängige Variablen haben und sich entsprechend die Menge an Resten  $\delta_i$  verdoppelt:

$$\min_{\boldsymbol{\theta}, \delta} \sum_{i=1}^{2n} \delta_i^2 \quad (11.6)$$

### 11.1.2. Gewichtete vs. ungewichtete Regression OLS

Für den Fall, dass die Störungsterme nicht die gleiche Varianz haben, ist die Verwendung von (11.2) nicht mehr zulässig bzw. ihre Verwendung liefert verzerrte Schätzer der Parameter  $\boldsymbol{\theta}$ . Man löst das Problem, indem für jeden Rest  $\epsilon_i$  eine Gewichtung  $w_i$  so eingeführt wird, dass die Bedingungen der gleichen Varianz der Störungsterme der ungewichteten OLS wieder gelten. Das Minimierungsproblem für die gewichtete OLS lautet dann [86, 21]:

$$\min_{\boldsymbol{\theta}, \epsilon} \sum_{i=1}^n w_i \epsilon_i^2 \quad (11.7)$$

Für eine ausreichende Zahl an durchgeführten Replikaten könne wir  $w_i \equiv 1/s_i^2$  verwenden, wobei  $s_i$  die Standardabweichung für des  $i$ ten Wertes  $y_i$  der Antwortvariable ist.

### 11.1.3. Ausreißer

Um Ausreißer in den Datenfits bestimmen zu können, verwenden wir einfache studentisierte Reste (auch als *unit normal deviate form* bezeichnet [29])

$$\epsilon_{S,i} = \frac{(y_i - f(x_i, \boldsymbol{\theta}))}{\hat{s}} = \frac{\epsilon_i}{\hat{s}} \quad (11.8)$$

und plotten diese gegen  $x_i$ .  $\hat{s}$  ist die geschätzte residuale Standardabweichung, die wir aus dem Datenfit erhalten. Mit der Verwendung der OLS nehmen wir bereits an, dass die Reste  $\epsilon_i$  aus einer Normalverteilung mit einer Standardabweichung  $\sigma$  und einem Erwartungswert von null stammen, und die geschätzte residuale Standardabweichung  $\hat{s}$  ein Schätzer für  $\sigma$  sei. Daher sollten die studentisierten Reste  $\epsilon_{S,i}$  aus einer Standardnormalverteilung stammen und sich 95% aller Reste in einem Band mit den Grenzen von etwa  $(-2,2)$  befinden. Zur Festlegung des 95%-Intervalls benutzen wir statt der Standardnormalverteilung jedoch die entsprechende  $t$ -Verteilung. Ausreißer befinden sich nun mindestens dreimal (besser: viermal) der Standardabweichung von null entfernt.

#### 11.1.4. ITC-Regression

Für die Regression multipler ITC-Daten verwenden wir Modelle, in denen wir zwischen global (auf alle Datensätze bezogen) und lokal (auf den einzelnen Datensatz bezogen) anzupassende Parametern unterscheiden. Für die ITC haben wir vier Parameter ( $K_D$ ,  $\Delta H$ ,  $N$  bzw.  $M$  und die Verdünnungswärme), wobei wir  $N$  bzw.  $M$  und die Verdünnungswärme in einer Gruppe zusammenfassen. Der Regressionstyp ist in der Zahl *xxx* kodiert, deren drei Nummern entweder den Wert null (globaler Parameter) oder eins (lokaler Parameter) annehmen können. Die erste Ziffer bezieht sich auf die  $K_D$ , die zweite auf  $\Delta H$ , und die dritte auf  $N$  (bzw.  $M$ ) und die Verdünnungswärme. Wichtige Regressionstypen sind:

**000** – Alle Parameter sind globale Parameter

**001** – Der Parameter  $N$  (bzw.  $M$ ) und die Verdünnungsparameter sind lokale,  $K_D$  und  $\Delta H$  globale Parameter.

**011** – Die Parameter  $\Delta H$ ,  $N$  (bzw.  $M$ ) und die Verdünnungswärme sind lokale und die  $K_D$  ist der globale Parameter.

**111** – Alle Parameter sind lokale Parameter: Jeder Datensatz wird separat gefittet. Die Werte für die  $K_D$  und  $\Delta H$  werden gemittelt. Dabei werden die einzelnen  $K_D$ -Werte mit (7.6) in die freie Enthalpie  $\Delta G^\circ$  umgerechnet, dann deren arithmetischer Mittelwert gebildet und dann wieder von  $\Delta G^\circ$  nach  $K_D$  zurückgerechnet.

## 11.2. Bestimmung der Messunsicherheiten und der Konfidenzintervalle

Die Messunsicherheiten der zu bestimmenden Parameter werden als Standardfehler über die Varianz-Kovarianzmatrix aus dem Datenfit bestimmt. Für die abgeleiteten Größen berechnen wir die Messunsicherheiten über das Fehlerfortpflanzungsgesetz [81]. Die Messunsicherheiten werden in Klammern hinter die Zahl des Messwertes angegeben, bspw. 20 (3)  $\mu\text{M}$ . Die Messunsicherheit wird auf eine bedeutsame Ziffer gerundet und der dazugehörige Messwert nicht genauer angegeben, als es die Messunsicherheit zulässt.

Die wichtigste Frage, die wir in dieser Arbeit behandeln, ist, ob sich die  $K_D$  bzw.  $\Delta G^\circ$  unserer Peptidchimären von der eines Referenzliganden unterscheiden. Wir beantworten diese Frage auf zwei Wegen:

- Über die Aufstellung der 95 %-Konfidenzintervalle für  $K_D$  bzw.  $\Delta G^\circ$ . Überlappen sich die Konfidenzintervalle nicht, so können wir die Nullhypothese  $H_0 : K_{D,1} = K_{D,2}$  bzw.  $\Delta G_1^\circ = \Delta G_2^\circ$  auf dem 5 %-Niveau ablehnen, sofern die Anzahl der Messpunkte für jeden  $K_D$  bzw.  $\Delta G^\circ$  größer als 10 ist [104]. Überlappen sich die Konfidenzintervalle teilweise, so darf nicht ohne weiteres gefolgert werden, die Parameter würden sich nicht signifikant unterscheiden [104].
- Wir testen die Signifikanz der Differenz  $\Delta\Delta G^\circ$  über die Bildung des dazugehörigen 95 %-Konfidenzintervalls. Schliesst das Konfidenzintervall den Wert null nicht ein, so kann die Nullhypothese  $H_0 : K_{D,1} = K_{D,2}$  bzw.  $\Delta G_1^\circ = \Delta G_2^\circ$  auf dem 5 %-Niveau abgelehnt werden.

Nachfolgend sind die Berechnung der Standardfehler der abgeleiteten Größen  $\Delta G^\circ$ ,  $-T \Delta S$ ,  $K_{SV}$ , und die Verfahren zur Berechnung der Konfidenzintervalle für  $K_D$ ,  $\Delta G^\circ$  und  $\Delta\Delta G^\circ$  dargestellt.

### 11.2.1. Berechnung der Messunsicherheiten abgeleiteter Größen über das Fehlerfortpflanzungsgesetz

Der Fehler einer Größe  $y$ , die durch die Gleichung  $y = f(\mathbf{x})$  mit den fehlerbehafteten Größen  $\mathbf{x} = (x_1, \dots, x_N)$  gegeben ist, berechnet sich nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz, wie es mit der Gleichung 13 im Paragraph 5.2.2 des *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* [81] gegeben ist, zu:

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \frac{\partial f}{\partial x_i} \frac{\partial f}{\partial x_j} u(x_i, x_j) \quad (11.9)$$

Dabei ist  $u^2(x_i)$  die Varianz des fehlerbehafteten Parameters  $x_i$  und  $u(x_i, x_j)$  ist die Kovarianz der zwischen den fehlerbehafteten Parametern  $x_i$  und  $x_j$ .

Wir verwenden statt der Varianz  $u_c^2(y)$  deren Wurzel und erhalten die entsprechende Standardabweichung, die in unserem Fall gleichzeitig der Standardfehler von  $y$  ist.

**Messunsicherheit für den Mittelwert fehlerbehafteter Größen** Die Messunsicherheit eines Mittelwertes  $\bar{x}$  wird durch den Standardfehler  $SE = SD/\sqrt{n}$  angegeben, wobei SD die Standardabweichung und  $n$  der Umfang der Stichprobe ist. Wird jedoch der Mittelwert über fehlerbehaftete Werte gebildet, so müssen die Messunsicherheiten der Einzelwerte für die Bestimmung der Messunsicherheit des Mittelwertes berücksichtigt werden. Der erweiterte Standardfehler ist dann  $\sqrt{u_{\text{Mittelwert}}^2 + SE^2}$ , wobei sich die Messunsicher-

heit  $u_{\text{Mittelwert}}$  über die Definition des Mittelwertes und dem Fehlerfortpflanzungsgesetz (11.9) ergibt. Wir können den erweiterten Standardfehler dann schreiben als:

$$\text{SE}(\bar{x}) = \frac{1}{n} \sqrt{\sum_{i=1}^n u_{x_i}^2 + n \text{SD}^2} \quad (11.10)$$

Dabei ist  $u_{x_i}$  die Messunsicherheit des  $i$ ten Wertes der Stichprobe, aus dem der Mittelwert gebildet wird.

Die erweiterte Standardabweichung lässt sich dann analog bilden als:

$$\text{SD}(\bar{x}) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n u_{x_i}^2 + \text{SD}^2} \quad (11.11)$$

**Messunsicherheit für  $\Delta G^\circ$ ,  $-T \Delta S$  und  $K_{\text{SV}}$**  Für die Bestimmung der Messunsicherheit der freien Enthalpie  $\Delta G^\circ$  wird angenommen, dass die Varianz der Gaskonstante  $R$  und der Temperatur vernachlässigbar sei. Damit sind dann auch die entsprechenden Kovarianzen vernachlässigbar. Die Messunsicherheit für  $\Delta G^\circ$  lautet dann mit (7.6) und (11.9):

$$u_c(\Delta G^\circ) = \frac{RT}{K_{\text{D}}} u(K_{\text{D}}) \quad (11.12)$$

Dabei ist  $u(K_{\text{D}})$  der Standardfehler der  $K_{\text{D}}$ , wie er über den Datenfit ermittelt wurde.

Auch für die Berechnung der Messunsicherheit der entropischen Energie  $-T \Delta S$  wird davon ausgegangen, dass die Varianz für die Gaskonstante und der Temperatur  $T$  vernachlässigbar sei. Die Messunsicherheit lautet dann mit (10.13) und (11.9):

$$u_c(-T \Delta S) = \sqrt{\left(\frac{RT}{K_{\text{D}}} u(K_{\text{D}})\right)^2 + u^2(\Delta H) - 2 \frac{RT}{K_{\text{D}}} u(K_{\text{D}}, \Delta H)} \quad (11.13)$$

Hierbei ist  $u(\Delta H)$  der Standardfehler der Enthalpie, und  $u(K_{\text{D}}, \Delta H)$  die Kovarianz zwischen der  $K_{\text{D}}$  und  $\Delta H$ , wie sie über den Datenfit ermittelt wurden.

Die Messunsicherheit der Stern-Volmer-Konstante berechnet sich über (9.26) und (11.9), bei Vernachlässigung der Varianz für das Ausgangsvolumens  $V_0$  und der Konzentration des Quenchers der Stammlösung  $Q_{\text{t}}^\circ$ , zu:

$$u(K_{\text{SV}}) = \frac{V_0}{Q_{\text{t}}^\circ} u(m) \quad (11.14)$$

Hierbei ist  $u(m)$  der Standardfehler des Anstieges, wie er aus dem Datenfit berechnet

wurde.

### 11.2.2. Bestimmung der Konfidenzintervalle unter Annahme der Normalverteilung von $\Delta G^\circ$

Da die Dissoziationskonstante zum einen stets größer als null ist ( $K_D > 0$ ), und zum anderen die Dissoziationskonstante wegen (7.6) logarithmisch mit der freien molaren Reaktionsenthalpie  $\Delta G^\circ$  verknüpft ist, ist die Annahme der Normalverteilung für die Dissoziationskonstante fraglich: (i) als symmetrische Verteilung kann die Normalverteilung auch Werte umschließen, die kleiner als null sind, (ii) wegen (7.6) kann nicht sowohl die  $K_D$  als auch  $\Delta G^\circ$  normalverteilt sein. Darüber hinaus kann  $\Delta G^\circ$  prinzipiell auch Werte größer als null annehmen, außerdem sind die Zufallsgrößen für die  $\Delta G^\circ$  additiv (siehe (7.7)) und für die  $K_D$  multiplikativ (siehe (7.8)) verknüpft. Nach [104] können diese Hinweise so gewertet werden, dass  $\Delta G^\circ$  normal- und  $K_D$  lognormalverteilt sei.

Die Konfidenzintervalle für  $\Delta G^\circ$  und  $K_D$  lassen sich für die Annahme der Normalverteilung von  $\Delta G^\circ$  wie folgt bestimmen:

1. Berechne die Standardfehler  $SE_{\Delta G^\circ}$  für  $\Delta G^\circ$  mit (11.12).
2. Berechne die untere und die obere Grenze des Konfidenzintervalls für  $\Delta G^\circ$  mit

$$\Delta G_{KI}^\circ = \Delta G^\circ \pm t_{(n-m-p; 1-\alpha/2)} \times SE_{\Delta G^\circ} \quad (11.15)$$

Dabei ist  $t$  der Wert der t-Verteilung für das 97,5 %- bzw. 2,5 %-Quantil ( $\alpha = 5\%$ ) für den Freiheitsgrad  $(n - m - p)$  des Datenfittes ( $n$  ist die Anzahl der Messpunkte,  $m$  die Anzahl der für Umrechnungen und Normierungen benötigten Punkte [diese enthalten keine Information] und  $p$  ist die Anzahl der anzupassenden Parameter).

3. Rechne die untere und die obere Grenze des Konfidenzintervalls für  $\Delta G^\circ$  mit (7.6) in die untere und obere Grenze des Konfidenzintervalls für die  $K_D$  um.

### 11.2.3. Bestimmung der Konfidenzintervalle über die R-Funktion `confint`

Da wir nicht genau wissen, ob  $\Delta G^\circ$  einer Normalverteilung und die  $K_D$  einer Lognormalverteilung gehorcht – so hängt z. B. die konkrete Verteilung von  $K_D$  und  $\Delta G^\circ$  vom Grad der Nichtlinearität der Modellfunktion und vom aktuellen Datensatz ab [15] –, wollen wir ein Verfahren verwenden, das die Kenntnis der Verteilungsform nicht voraussetzt. Wir benutzen dazu die R-Funktion `confint`, die für die nicht-lineare Regression die `profile`-Funktion verwendet. Dabei wird der Konfidenzbereich für die zu fittenden Parameter

nach Bates et al. [15] über die sogenannte Profil- $t$ -Funktion bestimmt:

$$\tau(\theta_i) \equiv \text{sign}(\theta_i - \hat{\theta}_i) \frac{\sqrt{\tilde{S}S(\theta_i) - SS(\hat{\theta})}}{s} \quad (11.16)$$

Dabei ist  $\hat{\theta}_i$  der Wert des  $i$ ten angepassten Parameters,  $\hat{\theta}$  der Vektor aller angepassten Parameter,  $SS(\hat{\theta})$  die minimale Summe-der-Quadrate mit den gefundenen Parametern  $\hat{\theta}$ , und  $s$  der residuale Standardfehler für die gefundenen Parameter  $\hat{\theta}$ . Der Wert für  $\theta_i$  wird um den Wert von  $\hat{\theta}_i$  herum variiert.  $\tilde{S}S(\theta_i)$  ist die minimale Summe-der-Quadrate ((11.2) für die ungewichtete und (11.7) für die gewichtete Regression) für die anzupassenden Parameter  $\theta$  ohne  $\theta_i$  als anzupassenden Parameter, da  $\theta_i$  als fester Wert gesetzt wird. Die Teststatistik  $\tau(\theta_i)$  ist annähernd  $t$ -verteilt, daher kann aus den entsprechenden Werten für  $\tau(\theta_i)$  und dem bekannten Freiheitsgrad ( $n - m - p$ ) das gesuchte Konfidenzintervall berechnet werden [15]. Für die abgeleitete Grösse  $\Delta G^\circ$  wird das Konfidenzintervall aus dem Konfidenzintervall für die  $K_D$  über Gleichung 7.6 berechnet.

#### 11.2.4. Bestimmung der Messunsicherheit und Konfidenzintervalle über das Bootstrap-Verfahren

Die Profil- $t$ -Funktion genügt für die meisten Fälle innerhalb dieser Arbeit zur Berechnung der Konfidenzintervalle, jedoch kann mit ihr nicht der Fall der Fluoreszenztitration mit relevanter Hintergrundintensität behandelt werden: Das Rauschen des Hintergrunds, und damit die Messunsicherheit für den Anstieg  $F_{LB}$ , muss für die Messunsicherheit der  $K_D$  und  $\Delta G^\circ$  mit berücksichtigt werden (siehe (9.10)). Das ist aber mit der Profil- $t$ -Funktion nicht möglich, da der Fehler des Anstieges  $F_{LB}$  gar nicht in die reduzierte Intensität  $\Delta F$  mit eingeht.

Ein anderes Problem stellt die Berechnung der Messunsicherheiten dar. So setzt die Berechnung der Standardfehler aus der Varianz-Kovarianz-Matrix voraus, dass das nicht-lineare Regressionsproblem nicht all zu sehr von einem linearen Regressionsproblem abweicht. Die Berechnung der Messunsicherheiten der abgeleiteten Messgrößen wie der  $\Delta G^\circ$  nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz (11.9) setzt die Normalverteilung der Fehler voraus, was bspw. für die  $K_D$  nicht gegeben sein muss. Die berechneten Messunsicherheiten werden daher von den wirklichen, d. h. unverzerrten, Messunsicherheiten abweichen, wobei unklar bleibt, ob diese Abweichung überhaupt signifikant sei.

Diese Fragen lassen sich mittels der Bootstrap-Methode behandeln [25, 22, 33, 79]. Der Vorteil ist, dass diese Methode keine Annahme über die Art der Verteilung des Datensatzes oder der interessierenden Parameter braucht und auch für komplexe Regres-

sionsprobleme anwendbar ist.

Die Grundannahme der Bootstrap-Methode lautet: Sofern keine besseren Informationen vorliegen, ist der aktuelle Datensatz die beste Schätzung für die Verteilung der Grundgesamtheit, aus der dieser Datensatz gezogen wurde [22, 33]. Wir ersetzen daher diese unbekannte Verteilung durch die des Datensatzes, was auch als Plug-in-Prinzip bezeichnet wird [22, 33]. Aus dem bekannten Datensatz werden, über verschiedene Ansätze, neue künstliche Datensätze erzeugt, und daraus werden die interessierenden Parameter berechnet. Das wird oft genug wiederholt und so die Verteilung der interessierenden Parameter erzeugt. Ansätze zur Erzeugung der künstlichen Datensätze sind: (i) nichtparametrisches Resampling (Ziehen mit Zurücklegen von  $(x_i, y_i)$ -Datenpaaren), (ii) semi-parametrisches Resampling (Ziehen mit Zurücklegen des Rests  $\epsilon_i$  und Verrechnung mit dem angepassten Modell), und (iii) parametrisches Resampling [25]. Für die explizite CVM (ohne Bestimmung des stöchiometrischen Koeffizienten  $n$ ), die FT und den Hintergrund der FT bei mehr als einem Datensatz, wird das nichtparametrische Resampling verwendet. Für die ITC und den Hintergrund der FT wird das semiparametrische Resampling verwendet, wenn nur ein Datensatz vorliegt.

Aus der Bootstrap-Verteilung müssen dann die Konfidenzintervalle oder Standardabweichungen berechnet werden, wobei es speziell für die Konstruktion der Konfidenzintervalle eine Vielzahl an Methoden gibt [25, 79]. Wir verwenden hier die Bias-corrected and accelerated percentile method (BCa) [32, 25, 79] und implementieren sie in R für die FT, die explizite CVM und die ITC.

### 11.2.5. Bestimmung der Konfidenzintervalle für $\Delta\Delta G$

Wenn wir annehmen, dass die freie Enthalpie normalverteilt sei, können wir zur Beantwortung der Frage nach der statistischen Signifikanz des Unterschiedes in der Affinität des interessierenden Liganden zu einer Referenz die Differenz in der freien Enthalpie  $\Delta\Delta G$  und den  $t$ -Test verwenden.

Da wir im allgemeinen nicht im voraus wissen, ob die Varianzen und die Stichprobenumfänge (das sind in unserem Fall die Freiheitsgrade der Datenfits) der beiden zu vergleichenden  $\Delta G^\circ$ -Werte gleich oder ungleich sind, verwenden wir die „Behrens-Fischer“-Prüfgrösse [104]:

$$\hat{t} = \frac{|\Delta G_1^\circ - \Delta G_2^\circ|}{\sqrt{SE_{\Delta G_1^\circ}^2 + SE_{\Delta G_2^\circ}^2}} = \frac{|\Delta\Delta G|}{\sqrt{SE_{\Delta G_1^\circ}^2 + SE_{\Delta G_2^\circ}^2}} \quad (11.17)$$

Hierbei ist  $SE_{\Delta G^\circ}$  der über (11.12) berechnete Standardfehler für  $\Delta G^\circ$ . Überschreitet  $\hat{t}$  die Signifikanzschranke, so ist  $\Delta\Delta G$  ungleich null, wobei wir zweiseitig und mit einer

Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 5\%$  prüfen. Den für die Berechnung des kritischen  $t$ -Wertes benötigten Freiheitsgrad FG berechnen wir nach [104] zu:

$$\text{FG} = \frac{\left(\text{SE}_{\Delta G_1^\circ}^2 + \text{SE}_{\Delta G_2^\circ}^2\right)^2}{\frac{\text{SE}_{\Delta G_1^\circ}^4}{(n_1-1)} + \frac{\text{SE}_{\Delta G_2^\circ}^4}{(n_2-1)}} \quad (11.18)$$

Hierbei ist  $n$  der Freiheitsgrad des Datenfits.

Aus Gründen der Anschaulichkeit berechnen wir für  $\Delta\Delta G$  das 95 %-Konfidenzintervall, welches den gleichen Informationsgehalt wie der  $t$ -Test enthält, wobei wir die Vermutung der Normalverteilung von  $\Delta\Delta G$  ausnutzen [104]:

$$\Delta\Delta G_{\text{KI}}^\circ = (\Delta G_1^\circ - \Delta G_2^\circ) \pm t_{(\text{FG}; 1-\alpha/2)} \sqrt{\text{SE}_{\Delta G_1^\circ}^2 + \text{SE}_{\Delta G_2^\circ}^2} \quad (11.19)$$

Für den Fall, dass das 95 %-Konfidenzintervall den Wert Null nicht umschließt, ist die Differenz  $\Delta\Delta G^\circ$  auf dem 5 %-Niveau signifikant.

### Einfluss von zufälligen Fehlern für die Protein- und Ligandkonzentration auf $\Delta\Delta G$

Wir können die Messunsicherheiten für die Protein- und die Ligandkonzentration  $P_t^\circ$  und  $L_t^\circ$  nur grob schätzen. Um den Einfluss dieser Messunsicherheiten auf den Unterschied  $\Delta\Delta G^\circ$  zu untersuchen, führen wir eine Monte-Carlo-Simulation durch. Wir nehmen dabei eine bestimmte noch zu benennende Verteilung für die Protein- bzw. Ligandkonzentration an, und simulieren damit und dem entsprechenden Datensatz sowie der dazugehörigen Auswertungsmethode eine möglichst große Stichprobe für die  $K_D$  und den dazugehörigen Standardfehler  $\text{SE}_{K_D}$ . Damit berechnen wir nach (7.6) und (11.12) die Werte für  $\Delta G^\circ$  und  $\text{SE}_{\Delta G^\circ}$ , und mit (11.17) und (11.18) die Werte für  $\hat{t}$  und den Freiheitsgrad FG. Wir fragen dann, ob der Betrag jedes einzelnen Wertes für  $\hat{t}$  den, mit zu  $\hat{t}$  gehörenden Freiheitsgrad FG bestimmten, kritischen Wert  $t_{\text{krit.}} = t_{(\text{FG}; 1-\alpha/2)}$  überschreitet. Dabei setzen wir die Irrtumswahrscheinlichkeit auf  $\alpha = 5\%$ . Wir zählen dann alle Werte die  $t_{\text{krit.}}$  überschreiten und dividieren diese Zahl durch die Anzahl der durchgeführten Vergleiche. Wir erhalten damit die Wahrscheinlichkeit, mit der  $t_{\text{krit.}}$  überschritten wurde. Diese sollte größer gleich 95 % sein, dann ist die beobachtete Differenz  $\Delta\Delta G$  auch unter der Annahme der entsprechenden Fehler für die Protein- und Ligandkonzentration signifikant.

### 11.3. Güte des Fits

Um die Güte des Fits angeben zu können, verwenden wir in dieser Arbeit die Maße  $R^2$  [29],  $Q$  [94] und  $P$  [104]. Zusätzlich definieren wir uns ein neues Maß  $R_{\text{linear}}^2$ , welches besser an die Situation für FT und die ITC angepasst ist.

#### 11.3.1. Das Maß $R^2$

Das Maß  $R^2$

$$R^2 \equiv 1 - \frac{SS_{\text{error}}}{SS_{\text{total}}} = 1 - \frac{\sum_i (y_i - f_i)^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2} \quad (11.20)$$

gibt an, inwieweit sich der verwendete Datenfit von einer horizontalen Geraden unterscheidet, d. h.  $R^2$  sagt etwas über die Korreliertheit von  $x_i$  mit  $y_i$  aus [29]. Zum Datenfit gehört die minimale Summe-der-Quadrate  $SS_{\text{error}}$ , wie sie sich mit den im Datenfit angepassten Parametern ergibt, und zur horizontalen Gerade die totale Summe-der-Quadrate  $SS_{\text{total}}$ , mit  $\bar{y}$  dem Mittelwert über alle gemessenen  $y_i$  (siehe auch Abb. 11.1).

Der Vorteil von  $R^2$  ist seine allgemeine Anwend- und leichte Berechenbarkeit. Nachteilig wirkt sich jedoch die relative Unempfindlichkeit des Maßes für die FT und die ITC aus: Der Datenfit muss schon sehr schlecht sein, damit  $R^2$  kleiner als 0,9 wird. Wir verwenden dieses Maß daher nur für die CVM, da hier eine schlechte Verteilung der Messpunkte diese nur wenig von einer horizontalen Geraden unterscheidbar macht. Da wir allerdings für die CVM eine gewichtete Regression durchführen, definieren wir  $R^2$  abweichend mit:

$$R^2 \equiv 1 - \frac{\sum_i \left( \frac{y_i - f_i}{s_i} \right)^2}{\sum_i \left( \frac{y_i - \bar{y}}{s_i} \right)^2} \quad (11.21)$$

Hierbei ist  $s_i$  die zum  $i$ ten Datenpunkt gehörende Standardabweichung.

#### 11.3.2. Das Maß $R_{\text{linear}}^2$

Wegen der Unempfindlichkeit von  $R^2$  für die FT und ITC wollen wir uns ein empfindlicheres und damit auch aussagekräftigeres Maß definieren. So ist es für Titrationsen mit einem prinzipiell hyperbolischen oder sigmoiden Verlauf wichtig, dass sich der Kurvenverlauf hinreichend von einem reinen linearen, d. h. geraden, Verlauf unterscheidet, da sonst die geschätzten Parameter nur sehr ungenaue bis völlig abwegige Werte annehmen. In solchen Fällen kann  $R^2$  dennoch nahe eins sein. Daher soll  $SS_{\text{total}}$  durch die Summe der Abstandsquadrate einer linearen Funktion ersetzt werden. Die lineare Funktion

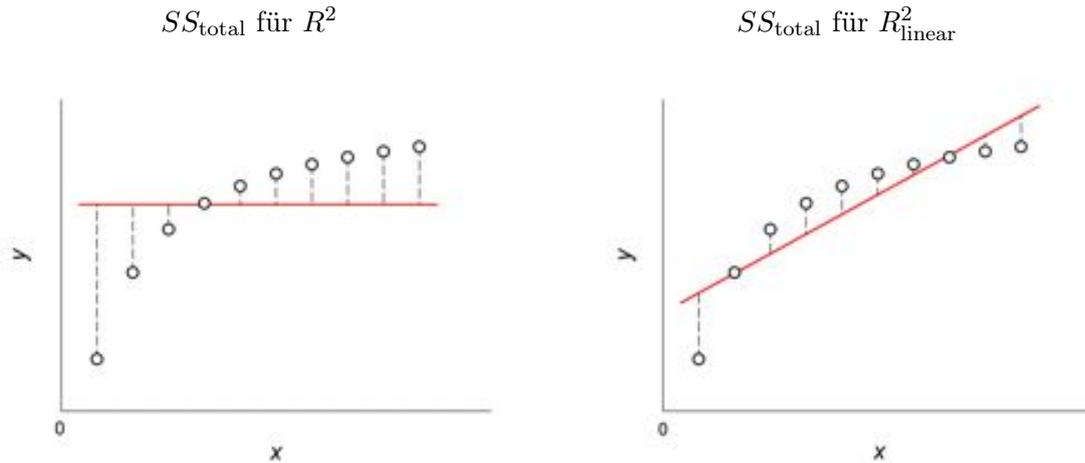


Abbildung 11.1.: Unterschiede in der Berechnung von  $SS_{\text{total}}$  für  $R^2$  (*links*) und  $R_{\text{linear}}^2$  (*rechts*).

$f_{i, \text{linear}} = a x_i + b$  stellt den besten Fit der Anpassung einer Geraden an die entsprechenden Daten dar (siehe auch Abb. 11.1). Das neue Maß heisst  $R_{\text{linear}}^2$  und ist analog zu  $R^2$  definiert:

$$R_{\text{linear}}^2 \equiv 1 - \frac{\sum_i (y_i - f_i)^2}{\sum_i (y_i - f_{i, \text{linear}})^2} \quad (11.22)$$

Das Maß  $R_{\text{linear}}^2$  gibt also Auskunft darüber, wie stark sich die Daten von einem rein linearen Modell unterscheiden. Es nimmt einen Wert zwischen null (kein Unterschied zu einem linearen Modell) und eins (völliger Unterschied zum linearen Modell) an.

Für die ITC muss die die Abhängigkeit der Wärmeentwicklung vom Injektionsvolumen  $dV_i$  berücksichtigt werden. Analog zu (10.8) definieren wir für  $f_{\text{linear}} = Q_{\text{linear}}$  für die ITC:

$$Q_{\text{linear}} = dV_i \overbrace{(a \Delta V + b)}^{\bar{Q}_{\text{linear}}} \quad (11.23)$$

### 11.3.3. Die Maße $Q$ und $P$

Während  $R^2$  bzw.  $R_{\text{linear}}^2$  die Abweichung des Datenfits von einer vorgegebenen Konfiguration angeben, kann mit dem  $Q$ -Wert die Übereinstimmung des Datenfits mit den Daten bestimmt werden [94]. Allerdings sind dazu Replikate der jeweiligen Messung nötig, um die individuellen Standardabweichungen jedes einzelnen Datenpunktes zu bestimmen.

Die gewichtete minimale Summe-der-Quadrate

$$\hat{\chi}^2 = \sum_{i=1}^{\bar{n}} \left( \frac{\bar{y}_i - f_i}{\sigma_i} \right)^2 \approx \sum_{i=1}^{\bar{n}} \left( \frac{\bar{y}_i - f_i}{s_i} \right)^2 \quad (11.24)$$

entspringt einer  $\chi^2$ -Verteilung mit dem Freiheitsgrad  $\bar{n} - p$ , wobei  $\bar{y}_i$  der Mittelwert der Replikate,  $\bar{n}$  die Anzahl der gemittelten Datenpunkte und  $p$  die Anzahl der anzupassenden Parameter ist. Der Wert von  $Q$  ist dann die rechtsseitige Überschreitungswahrscheinlichkeit von  $\hat{\chi}^2$  für eine  $\chi^2$ -Verteilung mit dem Freiheitsgrad  $\bar{n} - p$ . Der Wert von  $Q$  kann natürlich nur zwischen null und eins liegen, wobei mindestens ein Wert von 0,05 – entsprechend 5% – erreicht werden sollten, damit der Datenfit bedeutsam ist.

Wir nehmen an, dass die Terme der  $\chi^2$ -Summe normalverteilt seien, was aber auch die Annahme für die Durchführung des Datenfits ist (siehe auch (11.2)). Da wir die Standardabweichung  $\sigma_i$  für jeden Datenpunkt  $(\bar{y}_i, x_i)$  nicht kennen, ersetzen wir sie durch die empirische Standardabweichung  $s_i$ . Die Ersetzung von  $\sigma_i$  mit  $s_i$  führt aber meist zu dem klassischen Einwand, dass für die Berechnung von  $s_i$  sehr viele Replikate notwendig seien, da sonst  $s_i$  zu stark fehlerbehaftet sei. Wir sind der Ansicht, dass das die Verwendung von  $Q$  nicht notwendig unsicher macht.

Wir wollen zusätzlich zu  $Q$  auch noch den *lack-of-fit* berechnen. Nach Sachs et al. [104]<sup>3</sup> bilden wir die Prüfgröße

$$\hat{F} = \frac{\frac{1}{\bar{n}-p} \sum_{i=1}^{\bar{n}} n_i (\bar{y}_i - f_i)^2}{\frac{1}{N-\bar{n}} \sum_{i=1}^{\bar{n}} \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2} \quad (11.25)$$

die einer  $F$ -Verteilung mit  $(\bar{n} - p, N - \bar{n})$ -Freiheitsgraden entspringt. Hierbei ist  $N$  die Gesamtanzahl aller Datenpunkte,  $n_i$  die Anzahl an Replikaten für den gemittelten Datenpunkt  $(\bar{y}_i, x_i)$  und  $y_{ij}$  der Wert des  $j$ ten Replikats für  $\bar{y}_i$ . Der  $P$ -Wert ist die rechtsseitige Übertretungswahrscheinlichkeit von  $\hat{F}$  für eine  $F$ -Verteilung mit dem Freiheitsgrad  $(\bar{n} - p, N - \bar{n})$ . Wie der Wert von  $Q$  kann natürlich auch der  $P$ -Wert nur zwischen null und eins liegen, wobei mindestens ein Wert von 0,05 – entsprechend 5% – erreicht werden sollte, damit der Datenfit bedeutsam ist.

Ein Vorteil von  $P$  gegenüber  $Q$  ist die Möglichkeit,  $P$ -Werte auch für Datensätze zu berechnen, in denen nicht jeder Datenpunkt als Replikat vorliegt. Für  $\chi^2$  lässt sich dann nämlich  $s_i$  nicht berechnen und somit auch nicht  $Q$ , es sei denn solche Datenpunkte werden für die Berechnung von  $Q$  nicht mit betrachtet, was dann den Freiheitsgrad

<sup>3</sup>dort unter dem Abschnitt *Prüfung der Linearität einer Regression* geführt. Der *lack-of-fit* lässt sich aber auch für nichtlineare Regressionen einsetzen. Bei Sachs et al. wurde  $p$  entsprechend einer einfachen linearen Funktion gleich zwei gesetzt. Wir geben hier den allgemeinen Fall an.

weiter reduziert. Als ein weiterer Vorteil von  $P$  gegenüber  $Q$  brauchen wir für  $P$  nicht die Standardabweichungen  $s_i$  berechnen und setzen uns damit nicht der selben Kritik wie an  $Q$  aus.

#### 11.3.4. Verwendung der vier Maße

Sind für eine Messung Replikate vorhanden, so werden  $R^2$  (CVM) bzw. das hier neu definierte Maß  $R_{\text{linear}}^2$  (FT, ITC) und die beiden Werte  $Q$  und  $P$  angegeben. Der Grund liegt darin, dass diese Maße gegensätzlich agieren: ist der Datensatz sehr verrauscht, dann wird der Wert von  $R^2$  bzw.  $R_{\text{linear}}^2$  im Allgemeinen klein (d.h. er wird schlechter), während  $Q$  und  $P$  im allgemeinen ihrem maximalen Wert von eins zustreben. Ist umgekehrt der Datensatz sehr rauscharm, kann das verwendete Modell aber den Datensatz nicht ausreichend beschreiben, so strebt  $R^2$  bzw.  $R_{\text{linear}}^2$  im allgemeinen seinem Maximum entgegen (d.h. sie nehmen ihren „besten“ Wert von eins an), während die Werte für  $Q$  und  $P$  sehr klein werden und damit schlechter. Für die FT und die ITC hat die Verwendung von  $R_{\text{linear}}^2$  und  $Q$  und  $P$  den zusätzlichen Vorteil, eine nicht ausreichende Titrationskurve zu belegen, die dennoch rauscharm ist. In einem solchen Fall können  $Q$  und  $P$  maximal werden (guter Datenfit),  $R_{\text{linear}}^2$  wird dagegen klein (geringe Abweichung von einem rein linearen Modell).

Liegen für eine Titration keine Replikate vor, so wird nur das Maß  $R^2$  (CVM) bzw.  $R_{\text{linear}}^2$  (FT, ITC) angegeben.

#### 11.3.5. Hypothesentest zur Prüfung der einzelnen Koeffizienten im Modell

Nachdem wir die Signifikanz des Datenfits überprüft haben, folgt die Prüfung der Signifikanz der einzelnen Koeffizienten im Modell über die Teststatistik [104]:

$$\hat{t} = \frac{\theta_i}{SE_{\theta_i}} \quad (11.26)$$

Hierbei ist  $\theta_i$  der geschätzte Wert des entsprechenden Koeffizienten, und  $SE_{\theta_i}$  der dazugehörige Standardfehler.

Der Wert  $\hat{t}$  entstammt einer  $t$ -Verteilung mit dem Freiheitsgrad  $(n - m - p)$ , wobei  $n$  die Anzahl der Messpunkte,  $m$  die Anzahl der für Umrechnungen und Normierungen benötigten Punkte und  $p$  die Anzahl der anzupassenden Parameter ist. Der zu  $\hat{t}$  gehörende  $p$ -Wert sollte 0,05 (entsprechend 5%) nicht überschreiten. Andernfalls ist der entsprechende Koeffizient als nicht signifikant für das Modell zu betrachten, was bedeutet, dass das Modell geändert werden muss.



Teil IV.  
Ergebnisse



## 12. Einleitung zum Ergebnisteil

Um das Ziel der Entwicklung eines höheraffinen Liganden zu erreichen, müssen wir ein geeignetes Maß für die Affinität definieren. Klassischerweise ist dies die Dissoziationskonstante  $K_D$  (7.3), für unsere Zwecke ist jedoch die freie Enthalpie  $\Delta G^\circ$  (7.6) besser geeignet. Der Grund ist eben der Wunsch der Entwicklung höheraffiner Liganden: Wir sind an der *Änderung* der Affinität interessiert, wobei wir uns einen geeigneten Referenzpunkt für die Beobachtung dieser Änderung festlegen.

Wegen der Additivität der freien Enthalpie (7.7) lässt sich die Differenz  $\Delta\Delta G$  zwischen der freien Enthalpie der Referenz und des interessierenden Liganden als Maß für die Änderung in der Affinität verwenden (7.9). Würden wir die Dissoziationskonstante statt der freien Enthalpie verwenden wollen, so müssten wir – wegen der Multiplikativität der  $K_D$  (7.8) – das Verhältnis aus der  $K_D$  der Referenz und des interessierenden Liganden bilden. Wegen nachfolgender Überlegungen ist dies jedoch ungünstig.

Mit der Definition eines geeigneten Maßes für die Änderung der Affinität ist unsere Arbeit noch nicht getan. Von ausserordentlicher Wichtigkeit ist der Beleg der statistischen Signifikanz der beobachteten Affinitätsänderung, d. h. wir müssen die Frage beantworten, ob die beobachtete Änderung sich signifikant von null unterscheidet. Ohne diese Betrachtung ist eine Bewertung der Ergebnisse – ausser für offensichtliche Fälle – prinzipiell nicht möglich. Wir müssen uns hierbei vor Augen halten, dass die ermittelten Werte für die  $K_D$  bzw.  $\Delta G^\circ$  nur die wahrscheinlichsten Werte einer ganzen *Verteilung* der  $K_D$  bzw.  $\Delta G^\circ$  darstellen: Punktgenaues, fehlerfreies Messen ist praktisch unmöglich. Entsprechend erhalten wir dann auch für die Änderung der Affinität eine Verteilung, die wiederum von der Verteilung der  $K_D$  bzw.  $\Delta G^\circ$  der Referenz und des interessierenden Liganden abhängt. Aus grundsätzlichen Überlegungen heraus ist  $\Delta G^\circ$  eher normalverteilt als die  $K_D$  (siehe Abschnitt *Bestimmung der Konfidenzintervalle unter Annahme der Normalverteilung von  $\Delta G^\circ$*  auf Seite 76). Damit ist dann aber auch die Verteilung der Differenz  $\Delta\Delta G$  selbst wieder eher normalverteilt. Wir können daher die Signifikanz von  $\Delta\Delta G$  mittels eines  $t$ -Test bestimmen, wobei wir hier aus Gründen der Anschaulichkeit das 95 %-Konfidenzintervall der  $\Delta\Delta G$ -Verteilung angeben (siehe Abschnitt *Bestimmung der Konfidenzintervalle für  $\Delta\Delta G$*  auf Seite 78): Schliesst Konfidenzintervall den Wert

null nicht ein, so ist die beobachtete Differenz  $\Delta\Delta G$  mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % signifikant. Dann ist auch das Vorzeichen und der Betrag von  $\Delta\Delta G$  signifikant.

Zur Bestimmung des Konfidenzintervalls von  $\Delta\Delta G$  ist die Kenntnis der Standardabweichungen von  $\Delta G^\circ$  der Referenz und des interessierenden Liganden notwendig (siehe Seite 78). Diese bestimmten wir entweder über (11.12) aus dem Datenfit der jeweiligen Titrations über die Varianz-Kovarianz-Matrix, oder aber über die Bootstrap-Methode (siehe Abschnitt *Bestimmung der Messunsicherheit und Konfidenzintervalle über das Bootstrap-Verfahren* auf Seite 77). Dabei nahmen wir an, dass diese Standardabweichungen gute Schätzer für die entsprechenden  $\Delta G^\circ$ -Verteilungen seien. Dabei ist problematisch, dass die Fehler der Protein- und der Ligandkonzentration aus praktischen Gründen nicht mit in die ermittelten Standardabweichungen einfließen konnten. Um dennoch eine Abschätzung für den Einfluß dieser Messunsicherheiten auf die Signifikanz von  $\Delta\Delta G$  zu erhalten, führten wir eine Monte-Carlo-Simulation durch (siehe Abschnitt *Einfluss von zufälligen Fehlern für die Protein- und Ligandkonzentration auf  $\Delta\Delta G$*  auf Seite 79).

## 12.1. Fließdiagramme der Auswerteskripte

Im nachfolgenden wird der Aufbau der Auswerteskripte dargelegt. Die Skripte wurden in R [95] geschrieben, ausser für die implizite CVM, welches in Fortran – unter Verwendung des Programmpakets ODRPack [21] – geschrieben wurde.

### 12.1.1. FT

Das Flussdiagramm für das Auswerteskript für die FT ist in Abb. 12.1 angegeben.

Zuerst wurden die Eingabedaten als Datei eingelesen und dann, wenn nötig, die Fluoreszenzintensität korrigiert (siehe dazu Seite 58). Dazu wurde mit den Eingabedaten die Absorption der initialen Protein- und der zu titrierenden Ligandlösung für das aktuelle Setup des Fluoreszenzspektrometers und der Küvette angegeben. Aus der bekannten Verdünnung konnte dann die aktuelle Gesamtabsorption berechnet werden. Es war dabei günstiger die Absorption der Ligandstammllösung zu bestimmen und dann daraus die Absorption der zu titrierenden Ligandlösung zu berechnen, aus der dann schliesslich die aktuelle Ligandabsorption in der Küvette ermittelt wurde.

Es wurden dann die Rohdaten entsprechend (9.7) (Titrationsdaten) bzw. (9.8) (Hintergrund, sofern vorhanden) verrechnet. Falls nötig wurde der Hintergrund von den Titrationsdaten abgezogen. Dazu wurde der Hintergrund mit einem einfachen linearen Modell gefittet und der Anstieg dieses Modells wurde als Schätzer für den Wert von  $F_{LB}/V_0$  verwendet, der dann in (9.10) von den Titrationsdaten abgezogen wurde.

Einleitung zum Ergebnisteil

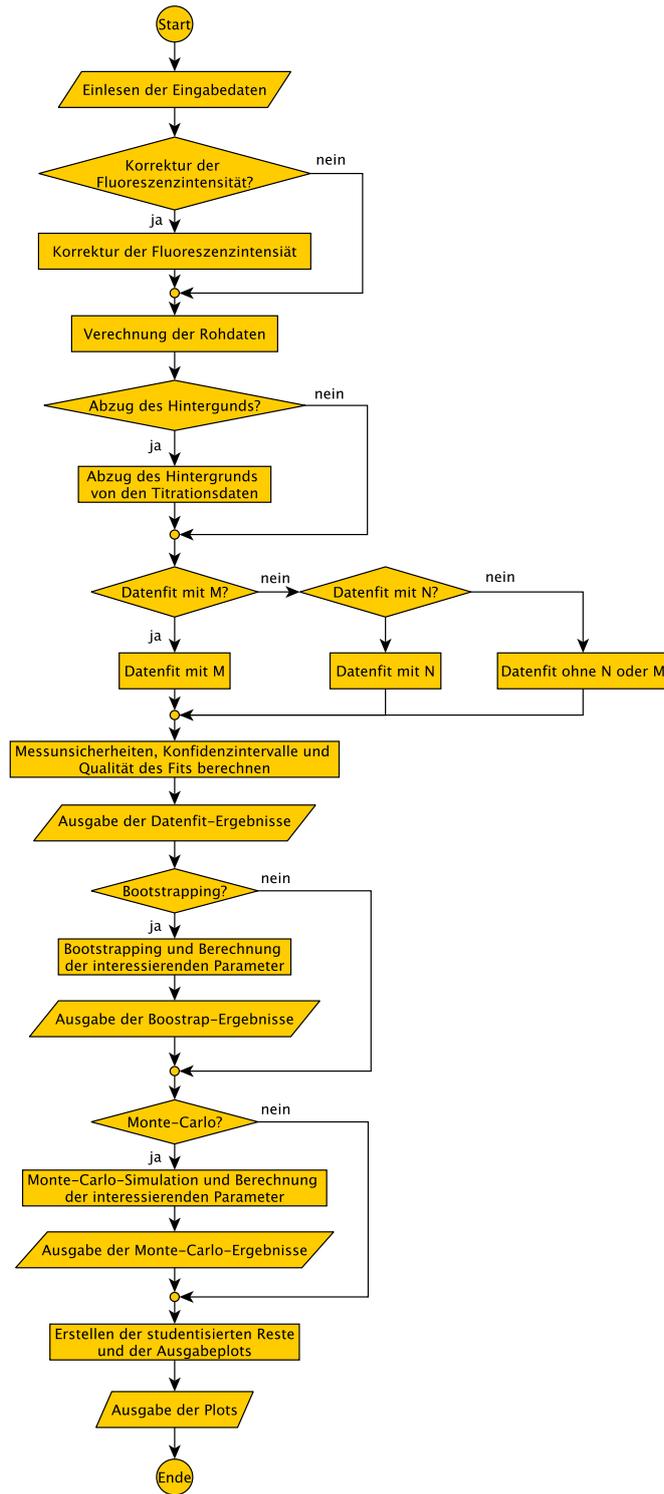


Abbildung 12.1.: Flussdiagramm des Skriptes zur Auswertung der FT.

Danach waren die Daten bereit für den eigentlichen Datenfit. Hierbei wird als (grundlegendes) Modell entweder (8.2), (8.5) oder (8.4) verwendet, wie es in den Eingabedaten festgelegt wurde. Wir hatten dann also entweder zwei anzupassende Parameter (den Proportionalitätsfaktor  $\delta$  und die  $K_D$  für (8.2)) oder drei anzupassende Parameter (zusätzlich den Faktor  $M$  bzw.  $N$  für (8.5) bzw. (8.4)). Es wurden dann die Messunsicherheiten für die angepassten Parameter über die Varianz-Kovarianz-Matrix berechnet, und für die freie Enthalpie über (11.12). Aus den ermittelten Parametern und den dazugehörenden Messunsicherheiten wurde die Signifikanz der einzelnen Parameter für den Datenfit geprüft (siehe Seite 83) und die Qualität des Datenfits mittels  $R_{\text{linear}}^2$  (11.22) und – sofern Replikate der Messungen vorlagen – die Werte für  $Q$  bzw.  $P$  mittels (11.24) bzw. (11.25) berechnet. Die Konfidenzintervalle wurden entsprechend (11.16) für die interessierenden Parameter über die Profil- $t$ -Funktion bestimmt. Sollte die Profil- $t$ -Funktion versagt haben, so wurde speziell für die  $K_D$  das Konfidenzintervall unter Annahme der Normalverteilung der  $\Delta G^\circ$  bestimmt (siehe Seite 76). Aus dem Konfidenzintervall für die  $K_D$  wurde das Konfidenzintervall für  $\Delta G^\circ$  entsprechend (7.6) berechnet.

An den Datenfit liess sich ein Bootstrapping anschliessen (siehe auch Seite 77), mit dem sich die ermittelten Messunsicherheiten und Konfidenzintervalle überprüfen liessen und – falls ein Hintergrund vorhanden war – sich die um die Messunsicherheit des Hintergrundes erweiterten Messunsicherheiten und die Konfidenzintervalle ermitteln liessen. Danach konnte eine Monte-Carlo-Simulation durchgeführt werden, mit der der Einfluss der (unbekannten) Messunsicherheit der Protein- und Ligandkonzentration auf die  $K_D$  bzw.  $\Delta G^\circ$  untersucht werden konnte. In diesem Abschnitt wurde in erster Linie die Monte-Carlo-Verteilung der  $K_D$  für den entsprechenden Datensatz der jeweiligen Protein-Ligand-Titration erzeugt, die dann mit einer anderen Monte-Carlo-Verteilung eines anderen Datensatzes einer anderen Protein-Ligand-Titration verglichen werden konnte (siehe auch Seite 79).

### 12.1.2. CVM

Da wir für die Auswertung von CVM-Daten zwei grundlegend verschiedene Modelle hatten (explizite CVM (9.15) und implizite CVM (9.17)), und sich die implizite CVM mit den gegenwärtigen Mitteln der Skriptsprache R nicht auswerten liess, wurde für die Auswertung der impliziten CVM ein Programm in Fortran unter Verwendung des Pakets `ODRPACK` geschrieben [21]. Dieses Programm konnte nicht alle geforderten Parameter zur Bewertung des Datenfits liefern, insbesondere fehlte eine Bewertung der Qualität des Fits. Da wir jedoch die gleichen Daten bereits mit der expliziten CVM ausgewertet hatten, nahmen wir an, dass die, für die explizite CVM bestimmte, Qualität des Fits auch

für die implizite CVM gelte.

### Explizite CVM

Das Flussdiagramm für das Auswerteskript für die explizite CVM ist in Abb. 12.2 angegeben.

Nachdem die Daten aus einer Datei eingelesen wurden, wurden sie entsprechend (9.18) normiert und die Restintensität  $\Delta F_{\text{norm}}$  nach (9.19) gebildet. Sollte eine Normierung anhand von (9.18) nicht möglich gewesen sein, so verwenden wir die Median-Methode, wie im Abschnitt *Normierung der CVM-Fluoreszenzintensität* auf Seite 55 beschrieben.

Die aufbereiteten Daten konnten nun gefittet werden, wobei uns zwei Modelle zur Verfügung standen. Das eine Modell (9.15) hatte zwei Parametern (Proportionalitätsfaktor  $\delta$  und die  $K_D$ ), und das zweite drei Parameter (zusätzlich noch die Proteinadsorption  $P_{\text{ads}}$ , siehe auch Abschnitt *Adsorption von Protein* auf Seite 55). Für die Regression wurde die ungewichtete (11.2) oder die gewichtete (11.7) OLS verwendet. Es wurden dann die Messunsicherheiten für die angepassten Parameter über die Varianz-Kovarianz-Matrix berechnet, und für die freie Enthalpie über (11.12). Aus den ermittelten Parametern und den dazugehörigen Messunsicherheiten wurde die Signifikanz der einzelnen Parameter für den Datenfit geprüft (siehe Seite 83) und die Qualität des Datenfits mittels  $R^2$  (11.20) für die ungewichtete oder (11.21) für die gewichtete OLS bestimmt, und die Werte für  $Q$  bzw.  $P$  mittels (11.24) bzw. (11.25) berechnet. Die Konfidenzintervalle wurden entsprechend (11.16) für die interessierenden Parameter über die Profil- $t$ -Funktion ermittelt. Sollte die Profil- $t$ -Funktion versagt haben, so wurde speziell für die  $K_D$  das Konfidenzintervall unter Annahme der Normalverteilung der  $\Delta G^\circ$  bestimmt (siehe Seite 76). Aus dem Konfidenzintervall für die  $K_D$  wurde das Konfidenzintervall für  $\Delta G^\circ$  entsprechend (7.6) berechnet.

Optional konnte dann der Einfluss der Protein- und Ligandkonzentration auf die Messunsicherheit der  $K_D$  bzw.  $\Delta G^\circ$  mittels Monte-Carlo-Simulation untersucht werden. Das Ergebnis der Monte-Carlo-Simulation konnte dann verwendet werden, um das Ergebnis der CVM mit anderen Protein-Ligand-Titrationsen zu vergleichen (siehe auch Seite 79).

### Implizite CVM

Das Flussdiagramm für das Auswerteskript für die implizite CVM ist in Abb. 12.3 angegeben.

Nach dem Einlesen der Eingabedaten wurden die Rohdaten verrechnet, insbesondere wurde  $\Delta F_{\text{norm}}$  wie für die explizite CVM gebildet. Es wurde dann der Datenfit mittels der

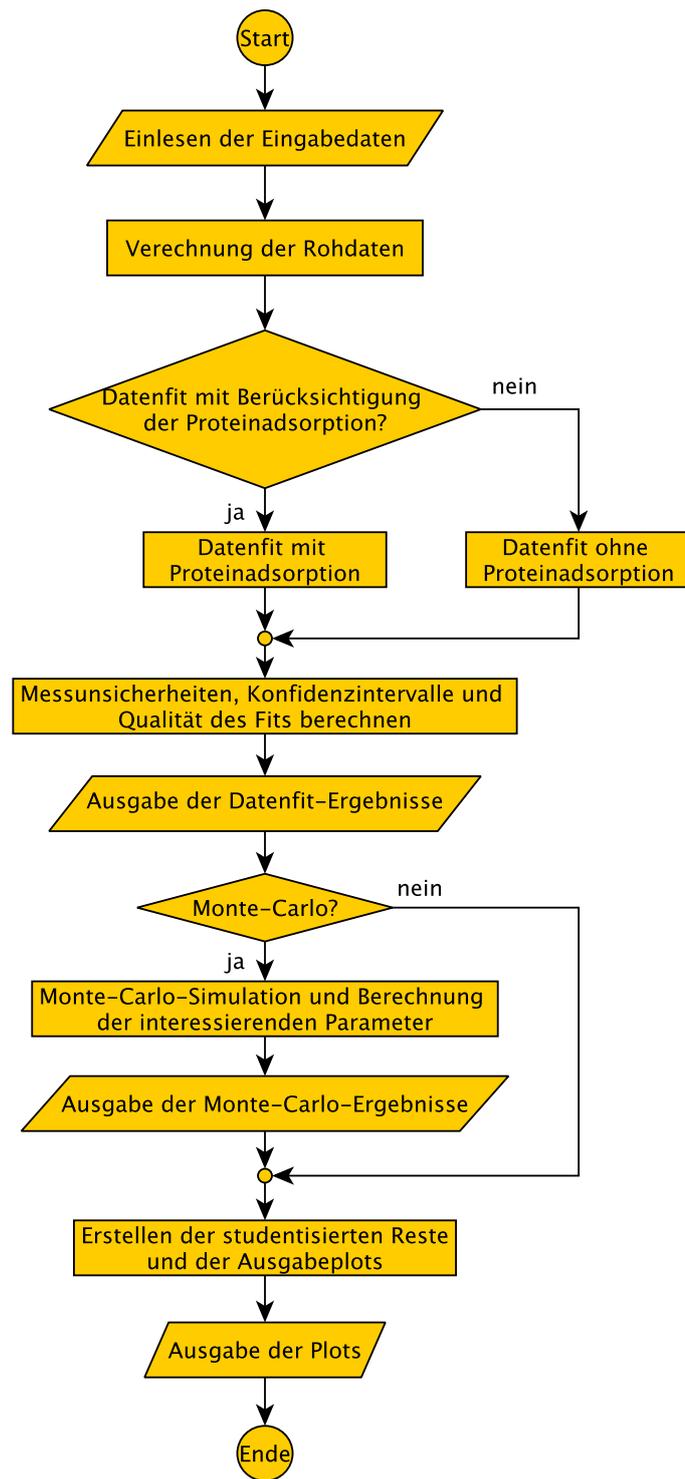


Abbildung 12.2.: Flussdiagramm des Skriptes zur Auswertung der expliziten CVM.

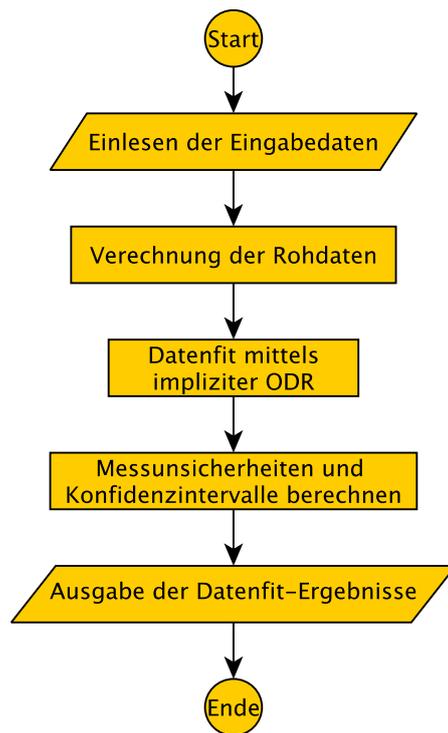


Abbildung 12.3.: Flussdiagramm des Skriptes zur Auswertung der impliziten CVM.

impliziten ODR und dem Modell (9.17) durchgeführt. Das Paket `ODRpack` war zwar in der Lage eine gewichtete implizite orthogonale Distanzregression durchzuführen, jedoch fehlen uns konkrete Fehlerangaben für die erklärende Variable. Daher verwendeten wir eine ungewichtete Regression.

Es wurden dann die Messunsicherheiten für die angepassten Parameter über die Varianz-Kovarianz-Matrix berechnet, und für die freie Enthalpie über (11.12). Aus den ermittelten Parametern und den dazugehörenden Messunsicherheiten wurde die Signifikanz der einzelnen Parameter auf den Datenfit geprüft (siehe Seite 83). Die Konfidenzintervalle wurden für die  $K_D$  unter der Annahme der Normalverteilung von  $\Delta G^\circ$  gebildet (siehe Seite 76), für den stöchiometrischen Koeffizient  $n$  wurde ebenfalls eine Normalverteilung angenommen.

### 12.1.3. ITC

Das Flussdiagramm für das Auswerteskript für die ITC ist in Abb. 12.4 angegeben.

Für die Auswertung wurde mittels des MicroCal-Auswerteprogramms [82] die Basislinie gebildet, von den Titrationskurve abgezogen und die Titrationspeaks integriert. Die ITC-Datensätze wurden dann mit den anderen notwendigen Daten in einer Datei zusammengefasst, die vom Auswerteskript eingelesen wurde. Das Skript bereitete die Eingabedaten als erstes für die weitere Verwendung auf. Mit den Eingabedaten wurde auch die Regressionsnummer übergeben, mit der die Art der Stratifikation der zu ermittelnden Parameter festgelegt wurde (siehe Abschnitt *ITC-Regression* auf Seite 73). Dann wurde der entsprechende Datenfit durchgeführt, wobei hier noch entschieden werden konnte, welches Modell verwendet wurde (entsprechend (8.2), (8.5) oder (8.4)). Danach wurden die Messunsicherheiten für die angepassten Parameter über die Varianz-Kovarianz-Matrix berechnet, und für die freie Enthalpie über (11.12). Wurde ein Parameter als lokaler Parameter deklariert, so wurde ein globaler Parameter über den arithmetischen Mittelwert aus den lokalen Werten gebildet und die dazugehörende Messunsicherheit über (11.10) aus den einzelnen Messunsicherheiten der einzelnen lokalen Parameter und der Varianz der lokalen Parameter berechnet. Aus den ermittelten Parametern und den dazugehörenden Messunsicherheiten wurde die Signifikanz der einzelnen Parameter auf den Datenfit geprüft (siehe Seite 83) und die Qualität des Datenfits mittels  $R_{\text{linear}}^2$  (11.22) und – sofern die Datenpunkte als Replikate vorlagen – die Werte für  $Q$  bzw.  $P$  mittels (11.24) bzw. (11.25) berechnet. Die Konfidenzintervalle wurden entsprechend (11.16) für die interessierenden Parameter über die Profil- $t$ -Funktion bestimmt. Sollte die Profil- $t$ -Funktion versagt haben oder sollte der entsprechende Parameter nicht global gewesen sein, so wurde speziell für die  $K_D$  das Konfidenzintervall unter Annahme der Normalverteilung der  $\Delta G^\circ$



bestimmt (siehe Seite 76). Aus dem Konfidenzintervall für die  $K_D$  wurde das Konfidenzintervall für  $\Delta G^\circ$  entsprechend (7.6) berechnet.

An den Datenfit liess sich ein Bootstrapping anschliessen (siehe auch Seite 77), mit dem sich die ermittelten Messunsicherheiten und Konfidenzintervalle überprüfen liessen. Danach konnte eine Monte-Carlo-Simulation durchgeführt werden, mit der der Einfluss der (unbekannten) Messunsicherheit der Protein- und Ligandkonzentration auf die  $K_D$  bzw.  $\Delta G^\circ$  untersucht werden konnte. In diesem Abschnitt wird in erster Linie die Monte-Carlo-Verteilung der  $K_D$  für den entsprechenden Datensatz der jeweiligen Protein-Ligand-Titration erzeugt, die dann mit einer anderen Monte-Carlo-Verteilung eines anderen Datensatzes einer anderen Protein-Ligand-Titration verglichen werden konnte (siehe auch Seite 79).

# 13. Ersetzung der Proline des ActA-Peptides mit dem X- und den Spir2-Baustein

Als Ausgangspeptid verwendeten wir die Sequenz SFEFPPPTEDEL aus dem Repeat 3 des ActA-Proteins aus dem Bakterium *Listeria monocytogenes* [85, 9], wobei der N- bzw. der C-Terminus des Peptids und seiner Chimären acetyliert bzw. amidiert war.

## 13.1. Bindungsdaten für die Ersetzungen mit X

Wir ersetzten sukzessiv je zwei Proline des ActA-Peptids mit dem X-Baustein (siehe auch Abb. 1.1), bis schliesslich alle Proline mit X ausgetauscht waren. Dabei beobachteten wir eine Zunahme der Affinität für die Ersetzung der letzten beiden, aber auch für die Ersetzung aller Proline mit dem Diprolinmimetikum.

Die mittels CVM und ITC gewonnenen Bindungsdaten für das Referenzpeptid Ac-SFEFPPPTEDEL-NH<sub>2</sub> und die Peptidchimären sind in Tabelle 20.2 zusammengefasst. Die beobachteten Differenzen in der freien molaren Reaktionsenthalpie  $\Delta\Delta G$  zwischen dem Referenzpeptid und den Peptidchimären sind in Tabelle 20.3 dargestellt. Die Ergebnisse der um die Protein- und Ligandkonzentration erweiterten Fehlerbetrachtung sind in Tabelle 20.4 abgebildet.

### 13.1.1. Bindungsdaten CVM

Die Varianz der einzelnen Messpunkte für die CVM waren nicht konstant, daher führten wir eine gewichtete Regression durch. Für die Modellfunktion (9.15) führte dies jedoch zu verzerrten Ergebnissen, gerade auch im Vergleich zur ungewichteten Regression unter Verwendung der ungemittelten Datenpunkte (siehe auch Abb. 13.1). Bei der ungewichteten Regression mussten wir aber für die PPX-Chimäre den Datenpunkt für  $\phi_L = 0,9$  entfernen, da sonst der Datenfit ebenfalls verzerrt war. Ausserdem war der  $Q$ - bzw.  $P$ -Wert für die Chimären PPX und XX für die gewichtete Regression null bzw. nahe null,

wenn wir die Modellfunktion (9.15) verwendeten (siehe auch Abb. 13.1). Wir benutzten

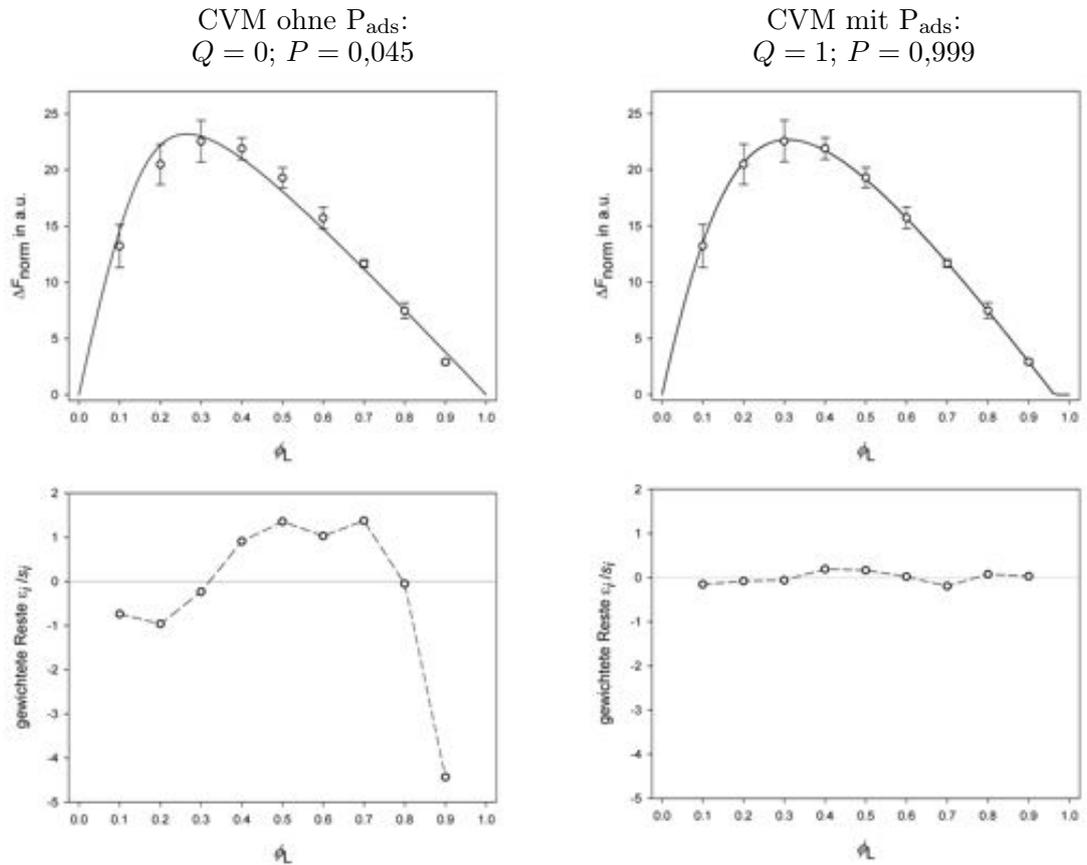


Abbildung 13.1.: CVM ohne (links) und mit Berücksichtigung (rechts) der Proteinadsorption nach (9.21) für VASP-EVH1 titriert mit dem PPX-Liganden. Oben sind die Plots der gefitteten Datenpunkte, unten die der gewichteten Reste dargestellt. Für den Plot der gewichteten Reste wurde jeder Rest mit seiner Standardabweichung dividiert. Der  $Q$  und der  $P$ -Wert ohne Berücksichtigung der Proteinadsorption ist null bzw. kleiner als 5%. Mit Berücksichtigung der Proteinadsorption werden  $Q$  und  $P$  eins bzw. fast eins.

daher (9.21) für die Proteinkonzentration  $P_t$ , nahmen also an, dass die Proteinadsorption einen signifikanten Einfluss hatte. Wir erhielten somit drei anzupassende Parameter für Regression:  $K_D$ ,  $\delta$  und  $P_{\text{ads}}$ . Letztere entspricht dem Betrag, um den die aktuelle totale Proteinkonzentration  $P_t$  aufgrund von Adsorption reduziert werden muss. Der Wert für  $P_{\text{ads}}$  ist nicht in der Tabelle 20.2 angeführt, da wir ihn – wie auch den Proportionalitätsfaktor  $\delta$  – als Nuisance-Parameter betrachten. Der gemittelte Wert der Proteinadsorption

über alle Titrationsen ist  $P_{\text{ads}} = 0,36$  (SD = 0,12; SE = 0,06)  $\mu\text{M}$  und die gemittelte Wert des Proportionalitätsfaktors  $\delta = 6,5$  (SD = 0,9; SE = 0,4) a.u./ $\mu\text{M}$ .

Die bei der Regression geschätzten Parameter hatten ein  $t$ -Verhältnis  $t = \theta/\text{SE}_\theta$  mit einem  $p$ -Wert der kleiner als 1 % für alle angepassten Datensätze war. Nur für die  $K_{\text{D}}$  für die XX-Chimäre war der  $p$ -Wert 2 %. Für die XX-Chimäre ist sowohl der Standardfehler, als auch das Konfidenzintervall recht groß und die Werte für  $Q$  und  $P$  sind klein. Die ermittelte  $K_{\text{D}}$  bzw.  $\Delta G^\circ$  hat daher leider nicht die Genauigkeit, wie für die anderen Chimären.

Nach den geschätzten Werten für die Dissoziationskonstante  $K_{\text{D}}$  und die molare freie Reaktionsenthalpie  $\Delta G^\circ$ , unterscheiden sich die Affinitäten der Chimären PXP und XX nicht von der Affinität des Referenzpeptides PPPP, innerhalb der ermittelten Messunsicherheiten. Im Vergleich zum Referenzpeptid bindet die Chimäre XPP dagegen schwächer und die Chimäre PPX stärker an VASP-EVH1 (ebenfalls im Rahmen der bestimmten Messunsicherheiten). Dabei gewinnen wir mit  $\Delta\Delta G = -3,0$  (0,3) kJ/mol mehr an Affinität für PPX, als wir mit  $\Delta\Delta G = +1,8$  (0,4) kJ/mol für XPP verlieren. Es zeigt, dass diese Differenzen  $\Delta\Delta G$  und ihre Vorzeichen statistisch signifikant sind.

**Bestimmung des stöchiometrischen Koeffizienten mittels impliziter CVMs** Um den stöchiometrischen Koeffizienten  $n$  aus (7.1) mittels CVM zu bestimmen, verwendeten wir (9.17) und führten ein ungewichtete implizite orthogonale Distanzregression durch [86, 21]. Dabei zeigt sich, dass nur für das Referenzpeptid PPPP und die Chimäre PPX ein sinnvoller Datenfit durchgeführt werden konnte. Für alle anderen Liganden wurde die Messunsicherheit für die  $K_{\text{D}}$  und  $\Delta G^\circ$  so groß, dass der Datenfit für diese Liganden bedeutungslos ist. Daher sind in Tabelle 20.5 nur die Ergebnisse für PPPP und PPX dargestellt. Zur Bestimmung der Konfidenzintervalle wurde angenommen, dass  $\Delta G^\circ$  normalverteilt, und entsprechend die  $K_{\text{D}}$  logarithmisch normalverteilt sei. Für den stöchiometrischen Koeffizienten  $n$  wurde eine Normalverteilung angenommen. Da die Konfidenzintervalle für  $n$  den Wert eins einschließen, lässt sich für die Bindung der Liganden PPPP und PPX an VASP-EVH1 eine Stöchiometrie von eins feststellen.

Dass der Datenfit für die XPP, PXP und XX Liganden keine statistisch bedeutsamen Schätzungen der gesuchten Parameter lieferte, führen wir darauf zurück, dass die totale Protein- und Ligandkonzentration,  $P_{\text{t}}^\circ$  und  $L_{\text{t}}^\circ$ , für die entsprechende  $K_{\text{D}}$  nicht im richtigen Verhältnis waren. So war das Verhältnis  $L_{\text{t}}^\circ/P_{\text{t}}^\circ$  für die Liganden 10 (PPPP), 5 (PPX) bzw. 25 (XPP), 15 (PXP) und 15 (XX). Für alle Liganden, bei denen der Datenfit nicht funktionierte, ist das Verhältnis größer als 10. Das Verhältnis sollte also kleiner als 10 sein. Dazu kann aber nicht einfach die Ligandkonzentration  $L_{\text{t}}^\circ$  verringert werden, da

dann die nichtlineare Intensität  $\Delta I$  nur schlecht bestimmbar ist (siehe auch (9.13)). Vielmehr muss dazu die Proteinkonzentration  $P_t^\circ$  erhöht werden. Diese Forderung läuft dann konform mit den Forderungen, die von Ingham für die Bestimmung des stöchiometrischen Koeffizienten mittels Job Plot gestellt wurde [62].

### 13.1.2. Bindungsdaten ITC

**Verwendete Regressionsmodelle für die ITC** Für die Auswertung der ITC-Daten verwendeten wir (8.5): Da wir mittels der  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren und der impliziten CVM zeigen konnten, dass wir eine eins-zu-eins Bindung vorliegen haben, bedeutet die Verwendung dieser Gleichung, dass wir die Konzentration  $L_t^\circ$  des Liganden in der Injektionspritze als anzupassenden Parameter für die Regression verwendeten. Dass ist deswegen sinnvoll, da wir die Konzentration des Proteins mittels UV/Vis recht genau und reproduzierbar bestimmbar ist. Die Bestimmung der Konzentration der Liganden erfolgte allein über die Einwaage. Zusätzlich war bekannt, dass das Lyophilisat etwa 80 % Peptid enthielt, der Rest waren andere Stoffe, wie z. B. Restwasser. Die Standardprozedur der MicroCal-Auswertung würde dagegen (8.4) nutzen und damit die anfängliche Proteinkonzentration  $P_t^\circ$  in der Messzelle als anzupassenden Parameter verwenden. Da wir aber bereits eine eins-zu-eins Bindung annehmen und wir die Proteinkonzentration besser schätzen können, als die Peptidkonzentration, kann die Verwendung von (8.4) zu einer Verzerrung der zu bestimmenden Werte für die  $K_D$  und  $\Delta H$  führen.

Zusammengefasst haben wir für die ITC-Auswertung vier zu bestimmende Parameter verwendet: die Dissoziationskonstante  $K_D$ , die molare Reaktionsenthalpie  $\Delta H$ , der Anpassungsfaktor für die Ligandenkonzentration  $M$  und die Verdünnungswärme  $Q_{\text{dil}}$ . Da wir die Verdünnungswärme als Nuisance-Parameter betrachten, haben wir ihn nicht in den Tabellen angegeben.

Eigentlich sollten sich die doppelt bestimmten ITC-Titrationsen mit dem Regressionstyp 000 oder 001 fitten lassen, d. h. alle Parameter sind global oder die Dissoziationskonstante  $K_D$  und  $\Delta H$  sind global, und die Anpassung für die Ligandenkonzentration  $M$  und die Verdünnungswärme  $Q_{\text{dil}}$  erfolgt für jede Titration separat. Das entspringt der Vorstellung, dass die  $K_D$  und  $\Delta H$  für die gleiche Reaktion, die gleichen Pufferbedingungen und für die gleiche Temperatur Konstanten sind, wohingegen  $M$  und  $Q_{\text{dil}}$  für verschiedene Titrationsen variieren dürfen, da hier Verdünnungsfehler und Diskrepanzen in der Zusammensetzung der Protein- und Ligandenlösung vorliegen könnten. Allerdings bot sich der Regressionstyp 001 deswegen nicht an, weil dann die Messunsicherheit für die  $K_D$  zunahm (z. B. für den Liganden XPP wird dann  $K_D = 41 (11) \mu\text{M}$ ) und die Qualität des Datenfits stark litt (siehe auch Abb. 13.2). Dabei fiel auf, dass die eingesetzten Konzentrationen

für das Protein und den Liganden für die Liganden PPPP, PPX und XX die gleichen waren. Nur für XPP war die eingesetzten Ligandkonzentrationen unterschiedlich, was aber eigentlich für die Schätzung von  $K_D$  und  $\Delta H$  unerheblich sein sollte. Die doppeltbestimmten Messungen wurden allerdings stets an zwei unterschiedlichen ITC-Maschinen durchgeführt: Während dieser Arbeit gab es an FMP und MDC drei verschiedene VP-ITC Maschinen, die auch alle für die Messserien in dieser Arbeit verwendet wurden. Nach Baranauskienė et al. [13] ist die Bestimmung der molaren Reaktionsenthalpie  $\Delta H$  keinesfalls gut reproduzierbar, wenn verschiedene ITC-Maschinen verwendet werden. So berichtet Baranauskienė et al. beispielsweise, dass die molare Reaktionsenthalpie der Bindung von 4-Carboxybenzenesulfonamide an Carbonat-Dehydratase II mit 14 verschiedenen ITC-Maschinen bestimmt wurde, wobei ein Wert von  $\Delta H = (-43,5 \pm 10,5)$  kJ/mol ermittelt werden konnte. Die Varianz ist erstaunlich hoch und bedeutet für unsere Arbeit, dass wir die Annahme fallen lassen müssen, dass  $\Delta H$  für die gleiche Reaktion, die gleichen Pufferbedingungen, die gleiche Temperatur, aber *unterschiedliche* ITC-Maschinen identisch und nur durch zufällige und nicht durch systematische Fehler belastet sei. Baranauskienė et al. empfehlen eine Kalibrierung von ITC-Maschinen mit bekannten chemischen Reaktionen wie Tris-Base mit  $\text{HNO}_3$  oder Silbernitrat mit NaCl-Lösung, da sie die elektrische Kalibrierung der Geräte, wie von den Herstellern empfohlen, für unzureichend erachten. Solche Kalibrierungen waren aber während dieser Arbeit mit den verwendeten VP-ITC Maschinen nicht durchgeführt worden, noch waren sie zu jenem Zeitpunkt dem Autor bekannt.

Für alle doppelt bestimmten ITC-Titrationen verwendeten wir den Regressionstyp 011, d. h. die Dissoziationskonstante  $K_D$  wurde als globaler, die Reaktionsenthalpie  $\Delta H$ , die Anpassung der Ligandenkonzentration  $M$  und die Verdünnungswärme  $Q_{\text{dil}}$  als lokal anzupassende Parameter verwendet (siehe für die ITC-Regression auch Seite 73). Der Grund ist unser Wunsch der Verringerung der Messunsicherheit für die  $K_D$ , durchaus auf Kosten der anderen zu bestimmenden Parameter: Werden alle Parameter als lokale Parameter verwendet, und danach gemittelt und die Messunsicherheit berechnet, so ist letztere für die  $K_D$  für unsere Belange zu groß. So beträgt die Standardabweichung für das Referenzpeptid PPPP und die Peptidchimären XPP, PPX und XX für den Regressionstyp 011: 1,3  $\mu\text{M}$ ; 2,2  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$  und 0,9  $\mu\text{M}$ . Für vollständige lokale Parameter (Regressionstyp 111) steigt die Standardabweichung für die gleichen Liganden auf 3,2  $\mu\text{M}$ ; 5,6  $\mu\text{M}$ ; 3,6  $\mu\text{M}$  und 3,8  $\mu\text{M}$  an. Damit würden unsere Aussagen zwecks Unterschiede in den  $K_D$ - bzw.  $\Delta G^\circ$ -Werten völlig im Unsicheren verschwinden.

In den Regressionsmodellen für die ITC wirkt  $\Delta H$  als Proportionalitätsfaktor, wie auch der Faktor  $\delta$  in (9.10) und (9.15). D. h. das  $\Delta H$  nicht die Form der Titrationskurve, und

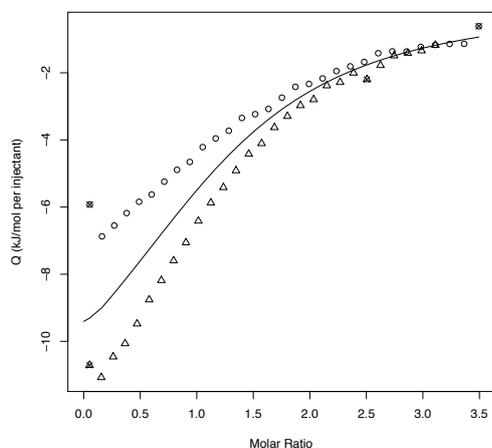
damit auch nicht die  $K_D$  beeinflusst: Der Regressionstyp 011 erhöht, gegenüber dem Typ 001, die mögliche Varianz für  $\Delta H$  und damit die Anpassbarkeit des Fittes (Verbesserung der Qualität des Fittes und damit Verringerung des Standardfehlers der Regression), ohne die Varianzmöglichkeit der  $K_D$  zu erhöhen.

**ITC-Bindungsdaten** Die – beinahe obligatorischen – Ausreißer in der ITC wurden über einen Plot der studentisierten Reste aufgefunden (siehe dafür auch den Abschnitt *Ausreißer* auf Seite 72).

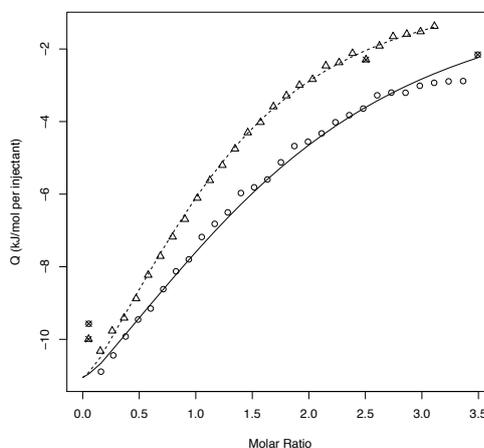
Für die gemittelte molare Reaktionsenthalpie  $\Delta H_{\text{mittel}}$  und molare entropische Energie  $-T \Delta S_{\text{mittel}}$  lässt sich für alle Chimären statistisch kein Unterschied zum Referenzpeptid feststellen, außer für PPX. Für diese Chimäre ist die Differenz für die gemittelte molare Reaktionsenthalpie und die gemittelte molare entropische Energie zum Referenzpeptid mit  $\Delta\Delta H = -10$  (5) kJ/mol und  $-T \Delta\Delta S = +7$  (5) kJ/mol sehr groß. Die 95 %-Konfidenzintervalle lauten für die molare Reaktionenthalpie  $[-18,6; -0,6]$  kJ/mol und für die molare entropische Energie  $[-1,8; +16,2]$  kJ/mol. D. h. wir finden nur für  $\Delta\Delta H$  einen signifikanten Unterschied, aber nicht für  $-T \Delta\Delta S$ . Die ITC wurde für den PPPP und den PPX-Liganden an zwei ITC-Maschinen durchgeführt, wobei für jeden Liganden die Datensätze an den beiden Maschinen gemessen wurden. Bilden wir die Differenzen für  $\Delta\Delta H$  und  $-T \Delta\Delta S$  jeweils separat für die beiden Datensätze so erhalten wir für  $\Delta\Delta H = -8,6$  (0,5) kJ/mol mit dem 95 %-Konfidenzintervall  $[-9,7; -7,5]$  kJ/mol bzw.  $\Delta\Delta H = -10,6$  (0,8) kJ/mol und  $[-12,2; -9,0]$  kJ/mol, und für  $-T \Delta\Delta S = +6,2$  (0,7) kJ/mol mit  $[+4,8; +7,6]$  kJ/mol bzw.  $-T \Delta\Delta S = +8$  (1) kJ/mol mit  $[+6,2; +10,0]$  kJ/mol. Die gefundenen Differenzen sind dann in allen Fällen signifikant. Stratifikation der Daten nach verwendeter ITC-Maschine scheint daher für die Bildung von Differenzen sinnvoll, will man die auftretenden Varianzen verringern. Akzeptieren wir dies, so lässt sich ein Unterschied in  $\Delta H$  und  $-T \Delta S$  für den PPX-Liganden gegenüber dem Referenzpeptid feststellen. Die Anzahl der Datensätze sollte jedoch erhöht werden, wenn diese Aussage gefestigt werden soll. Innerhalb dieser Arbeit sind wir aber eher an  $\Delta G^\circ$ , als an  $\Delta H$  oder  $-T \Delta S$  interessiert, und deren Varianz ist klein, weshalb wir keine weiteren Datensätze aufnahmen.

Mittelten wir über alle  $M$ -Werte, so erhielten wir  $\bar{M} = 0,80$  (SD = 0,09; SE = 0,05). Der Gehalt an Ligand entsprach also gemittelt nur etwa 80 % der nominellen Konzentration.

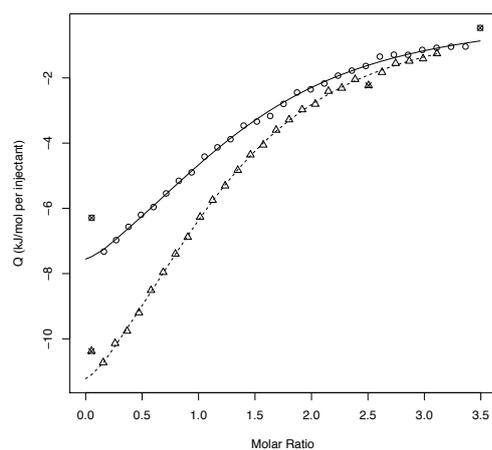
Reg.-Typ 000



Reg.-Typ 001



Reg.-Typ 011



Reg.-Typ 111

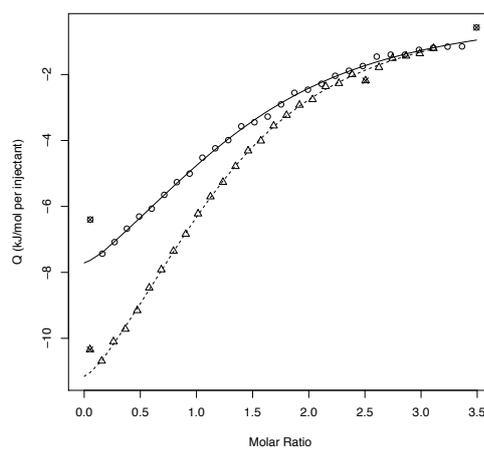


Abbildung 13.2.: Die verschiedenen Regressionstypen für die Regression multipler ITC-Datensätze am Beispiel von VASP-EVH1 + Ac-SFEFPPPPTEDEL-NH<sub>2</sub> (siehe auch den Abschnitt *ITC-Regression* auf Seite 73). Durchkreuzte Symbole stellen Ausreißer dar, die über die studentisierten Resste für den Regressions-Typ 011 ermittelt wurden (siehe auch den Abschnitt *Ausreißer* auf Seite 72). Die Konzentrationen an Protein und Ligand sind für beide Datensätze gleich, jedoch wurden sie an zwei verschiedenen ITC-Maschinen aufgenommen.

### 13.1.3. Vergleich der Bindungsdaten für CVM und ITC

Für die Affinitäten der Liganden PPPP, XPP, PXP und XX konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der CVM und der ITC gefunden, jedoch gab es einen signifikanten Unterschied in der Affinität für den PPX-Liganden mit  $\Delta\Delta G^\circ = -0,9 (0,2)$  kJ/mol Gewinn für die CVM- $\Delta G^\circ$  gegenüber der ITC- $\Delta G^\circ$  (siehe auch Tab. 20.3).

Interessanterweise ist der Wert für die Affinität des PPX-Liganden für die CVM höher als für die ITC. Es wäre eher zu erwarten gewesen, dass die CVM- $K_D$  größer gleich der ITC- $K_D$  sei. Der Grund ist die Verwendung des anzupassenden Faktors  $M$  für die ITC, was für die CVM so nicht möglich war, da dies in der R-Funktion `nls` zu einem singulären Gradienten führte. Der Faktor  $M$  passt uns die Ligandenkonzentration  $L_t^\circ$  in der Injektionsspritze an, wobei  $M$  kleiner als eins war (gemittelt ca. 0,8, siehe auch Tab. 20.2). Das erhöht uns die ermittelte Affinität in der ITC. Da wir mit der ITC den  $K_D$ -Wert über alle bei der Reaktion beteiligten wärmeändernden Prozesse bilden (wie Konformationsänderungen inklusive Umfaltungen des Proteins, Umprotonierungen deprotonierbarer Reste, etc.) und bei der CVM „nur“ die Änderungen in der Umgebung der drei in VASP-EVH1 enthaltenen Tryptophane beobachten (wobei eines, das Tryptophan W23. direkt in der Mitte der vier Proline sitzt), vermuten wir, dass die Affinität der PPX-Chimäre, im Vergleich zum Referenzpeptid, speziell um W23 zunimmt.

### 13.1.4. Einfluss der Messunsicherheiten für $P_t^\circ$ und $L_t^\circ$ auf den Unterschied in $\Delta\Delta G$

Bei der Auswertung wurde angenommen, dass die Messunsicherheiten für die Protein- und Ligandkonzentration vernachlässigbar seien. Dass ist wahrscheinlich nicht der Fall. Allerdings standen uns keine Angaben über diese Messunsicherheiten zur Verfügung. Wir geben hier daher eine Abschätzung zum Einfluss dieser Messunsicherheiten auf die ermittelte Differenz  $\Delta\Delta G$  zwischen den Referenzpeptid und den Peptidchimäre an. Wir nahmen dabei an, dass systematische Fehler für die Protein- und die Ligandkonzentration vernachlässigbar seien.

Für die Abschätzung führten wir eine Monte-Carlo Simulation durch. Wir nahmen dabei eine Gauß-Verteilung für die Verteilung der Protein- und Ligandkonzentration an. Der Erwartungswert der Verteilung sei die angenommene Konzentration für  $P_t^\circ$  bzw.  $L_t^\circ$  und die Standardabweichung seien 10 % oder 20 % der angesetzten Proteinkonzentration  $P_t^\circ$ , bzw. für die angesetzte Ligandkonzentration  $L_t^\circ$ . Für die Datensätze aus der CVM und der ITC wurden dann Stichproben im Umfang von 50000 (CVM) bzw. 10000 (ITC) Elementen genommen, wobei jedes Element aus der  $K_D$  und dem dazugehörigen Stan-

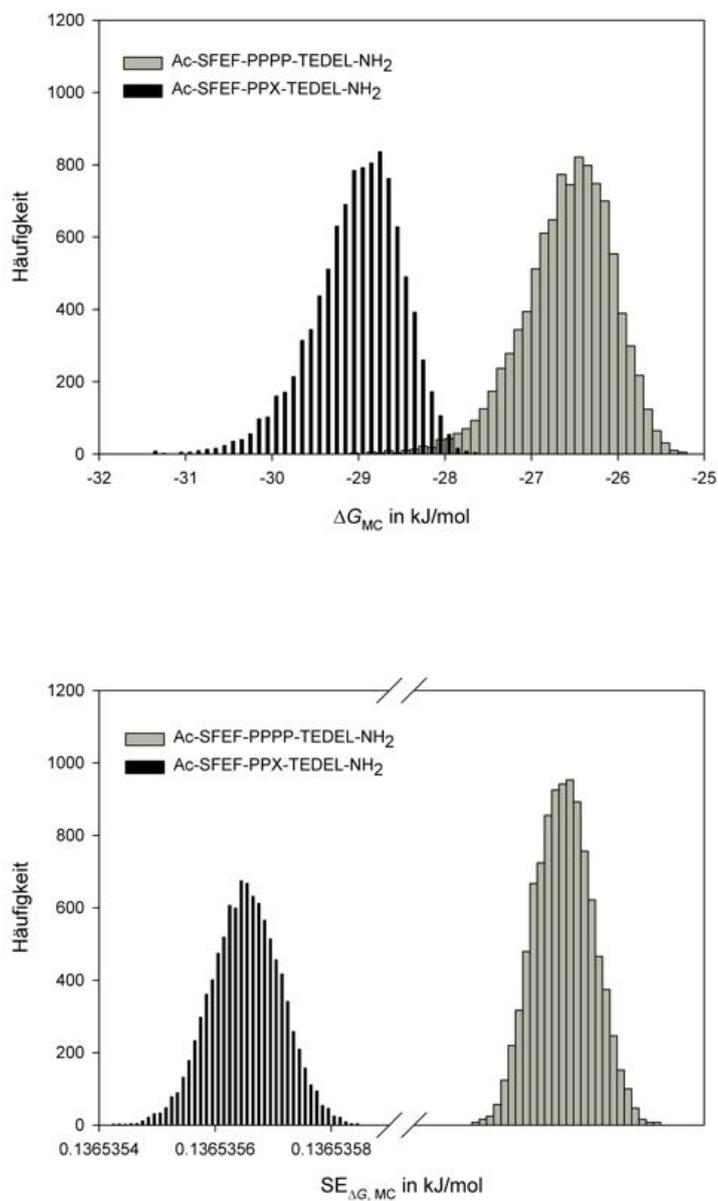


Abbildung 13.3.: Die Verteilungen für freien molaren Reaktionsenthalpie  $\Delta G^\circ$  (oben) und der dazugehörigen Standardfehler (unten) für die Monte-Carlo Simulation über den Einfluss der Messunsicherheiten der Protein- und der Ligandkonzentration. Es sind die Verteilungen der ITC-Datensätze für das Peptid Ac-SFEFPPPPTEDEL-NH<sub>2</sub> und die Peptidchimäre Ac-SFEFPPXTEDEL-NH<sub>2</sub> dargestellt. Die Streuungen der Verteilungen für die Standardfehler sind praktisch vernachlässigbar. Die  $\Delta G^\circ$ -Verteilungen der Monte-Carlo-Simulation müssen nicht normalverteilt sein. Für den *t*-Test ist nur notwendig, dass jeder Einzelwert von  $\Delta G^\circ$  der Monte-Carlo-Simulation normal verteilt sei.

Standardfehler  $SE_{K_D}$  bestand. In Abb. 13.3 ist beispielhaft das Ergebnis der Monte-Carlo Simulation für das Referenzpeptid und die PPX-Chimäre für die ITC-Datensätze dargestellt. Dort wurde die  $K_D$  und der dazugehörige Standardfehler bereits in  $\Delta G^\circ$  und  $SE_{\Delta G^\circ}$  umgerechnet. Dabei zeigte sich, dass die Streuung der Standardfehler  $SE_{\Delta G^\circ}$  praktisch vernachlässigbar ist. Dies liegt daran, dass für  $SE_{\Delta G^\circ}$  mit (11.12) das Verhältnis aus  $SE_{K_D}/K_D$  gebildet wird und zwischen der  $K_D$  und dem dazugehörigen Standardfehler eine lineare Beziehung besteht. Die  $K_D$  ist für die Monte-Carlo Simulation normalverteilt, daher ist die Verteilung für  $\Delta G^\circ$  schief. Für den  $t$ -Test ist dies jedoch ohne Belang, da wir dafür die Annahme verwenden, dass jede einzelne  $\Delta G_{MC}^\circ$  normalverteilt sei. In diesem Sinne ist die Verteilung der Monte-Carlo Simulation zweidimensional: in der ersten Dimension die Verteilung der Monte-Carlo Simulation und in der zweiten die Verteilung der einzelnen  $\Delta G_{MC}^\circ$ -Werte. Die MC lässt sich mit diesen Erkenntnissen vereinfachen, da es nur die Standardabweichung  $SD_{MC-K_D}$  der normalverteilten MC- $K_D$  bestimmt werden. Den Wert für  $SE_{\Delta G^\circ}$  muss nicht noch einmal bestimmt werden, da wir den Wert aus dem Datenfit verwenden können. Das reduziert den notwendigen Simulationsaufwand erheblich, da wir für die Bestimmung der  $SD_{MC-K_D}$  nur noch 500 Stichproben brauchen, wie es für die Bestimmung der SD bei normalverteilten Parametern durch die Bootstrap-Methode der Fall ist [79, 25].

Damit wurde, wie auf Seite 79 beschrieben, bestimmt, wie oft der Betrag des berechneten  $|\hat{t}|$ -Wert den kritischen  $t_{krit.}$ -Wert überschreitet. Die Ergebnisse sind in Tab. 20.4 zusammengefasst.

Die Differenz  $\Delta\Delta G$  des PPX-Chimäre zum Referenzpeptid war für alle getesteten Konditionen stets in mehr als 95 % der Fälle signifikant. D. h. das auch ein Fehler von 20 % für  $P_t^\circ$  und  $L_t^\circ$  nichts an der gefundenen Signifikanz der Differenz von  $\Delta\Delta G$  ändert. Akzeptieren wir den 20 %-Fehler als maximal auftretenden zufälligen Fehler, so ist die Erhöhung der Affinität des ActA-Peptids für die VASP-EVH1 Domäne durch den Ersatz der letzten zwei Proline mit dem X-Baustein wahrscheinlich echt.

Die Differenz  $\Delta\Delta G$  der XX-Chimäre zum Referenzpeptid war für die CVM natürlich nicht signifikant. Dagegen ist für die ITC  $\Delta\Delta G$  für alle getesteten Kombinationen in mehr als 95 % der Fälle signifikant. Akzeptieren wir auch hier den 20 %-Fehler als maximal auftretenden Fehler, dann ist die Erhöhung der Affinität des ActA-Peptids für die VASP-EVH1-Domäne durch den Ersatz aller Proline mit dem X-Baustein wahrscheinlich echt.

Für die XPP-Chimäre ist das Bild weniger eindeutig. So bleibt die Verringerung der Affinität nur dann für die CVM und die ITC signifikant, wenn der Fehler für  $P_t^\circ$  und  $L_t^\circ$  10 % nicht überschreitet. Der Einfluss des Fehlers für die Ligandenkonzentration  $L_t^\circ$  ist für die ITC unerheblich, da wir ja die Ligandenkonzentration über den Faktor  $M$  als

anzupassenden Parameter ausweisen. Das war so für die CVM nicht möglich. So ist für die ITC der Fehler für die Proteinkonzentration entscheidend, während für die CVM der Fehler für die Ligandkonzentration einen höheren Einfluss hat.

Für die Differenz in den Affinitäten für den PPX-Liganden für die CVM und die ITC war für alle getesteten Konditionen stets kleiner als 95 %. Es also möglich, dass die beobachtete Signifikanz von  $\Delta\Delta G$  zufälliger Natur ist.

## **13.2. HSQC-Spektren für den Protein–Ligand Komplex aus VASP-EVH1 und dem ActA-Peptid und den X-Baustein enthaltenen Chimären**

Die  $^{15}\text{N}$ -HSQC Assignments für VASP-EVH1 wurden von Dr. Linda Ball erstellt [9]. Die NMR-Spektren für VASP-EVH1 und den PPPP- und PXP-Liganden wurden von Dr. Christoph Brockmann aufgenommen.

In Abb. 13.4 und 13.5 sind die chemischen Verschiebungen auf das theoretische Modell (PDB-Eintrag: 1jng) der Bindung des Acta-Peptids Ac-SFEFPPPTEDEL-NH<sub>2</sub> an VASP-EVH1 geplottet [9]. Die Farben der chemischen Verschiebungen kodieren deren Stärke: grün (1,0 ppm bis <2,0 ppm), gelb (2,0 ppm bis <3,0 ppm), orange (3,0 ppm bis <4,0 ppm) und rot ( $\geq 4,0$  ppm). Wir haben starke Verschiebungen für die Backbone-NH für Lysin 71 und Alanin 75. Aber auch für das an der Bindung der Proline direkt beteiligte Tryptophan 23 ist stets erkennbar.

Die Verschiebungen des Indol-NH der drei Tryptophane des VASP-EVH1 sind in Abb. 13.6 dargestellt. Interessant für uns ist aber nur das Indol-NH vom Tryptophan 23, da dieses direkt an der Bindung der vier Proline beteiligt ist. Für die Chimären PXP und PPX ist die Verschiebung Indol-NH von Trp23 ähnlich zu der des Referenzpeptides, jedoch nicht für die Chimären XPP und XX. Dies kann bedeuten, dass die Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff des Peptid-Backbones und dem Indol-NH für die Chimären XPP und XX gestört ist.

## **13.3. Der Spir2-Baustein zur Ersetzung der ersten beiden Proline des ActA-Peptids**

Nach der Untersuchung der Ersetzungen der Proline mit dem X-Baustein, wendeten wir auch den Spir2-Baustein (siehe Abb. 1.1) als Diprolinersatz an. Da der Spir2-Baustein aber erst sehr spät bei dieser Arbeit zur Anwendung kommen konnte, wurde nur ein

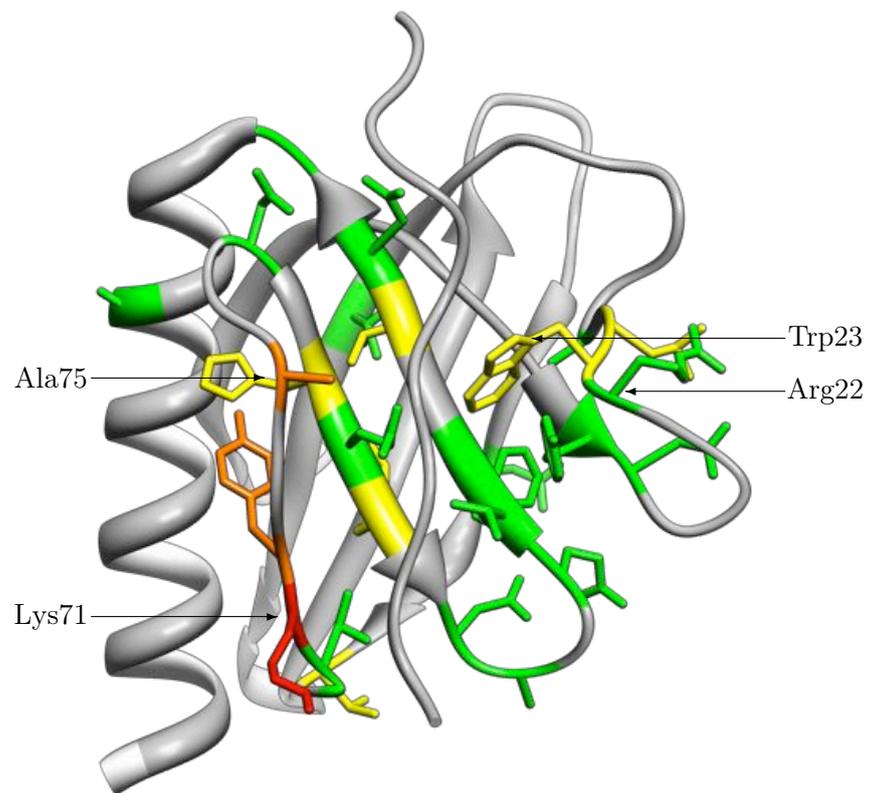


Abbildung 13.4.: Chemische Verschiebungen für VASP-EVH1 + Ac-SFEFPPPTEDEL-NH<sub>2</sub>, ermittelt aus den <sup>15</sup>N-HSQC-Spektren (Mapping auf 1jng [9]). Als graue Schlange im Vordergrund ist der Backbone des modellierten Peptids erkennbar.

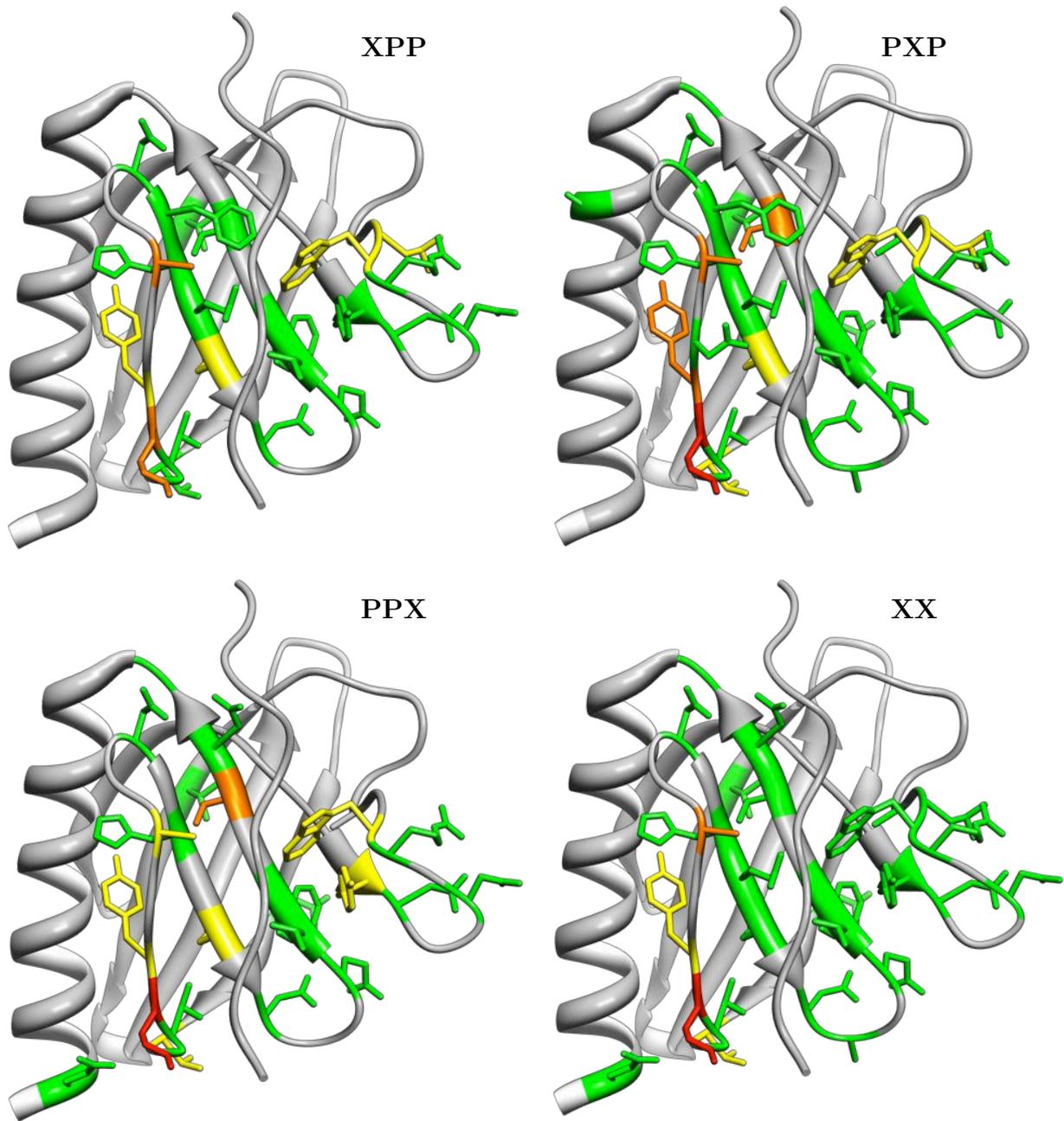


Abbildung 13.5.: Chemische Verschiebung ermittelt aus den  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren für VASP EVH1 + X-Liganden.

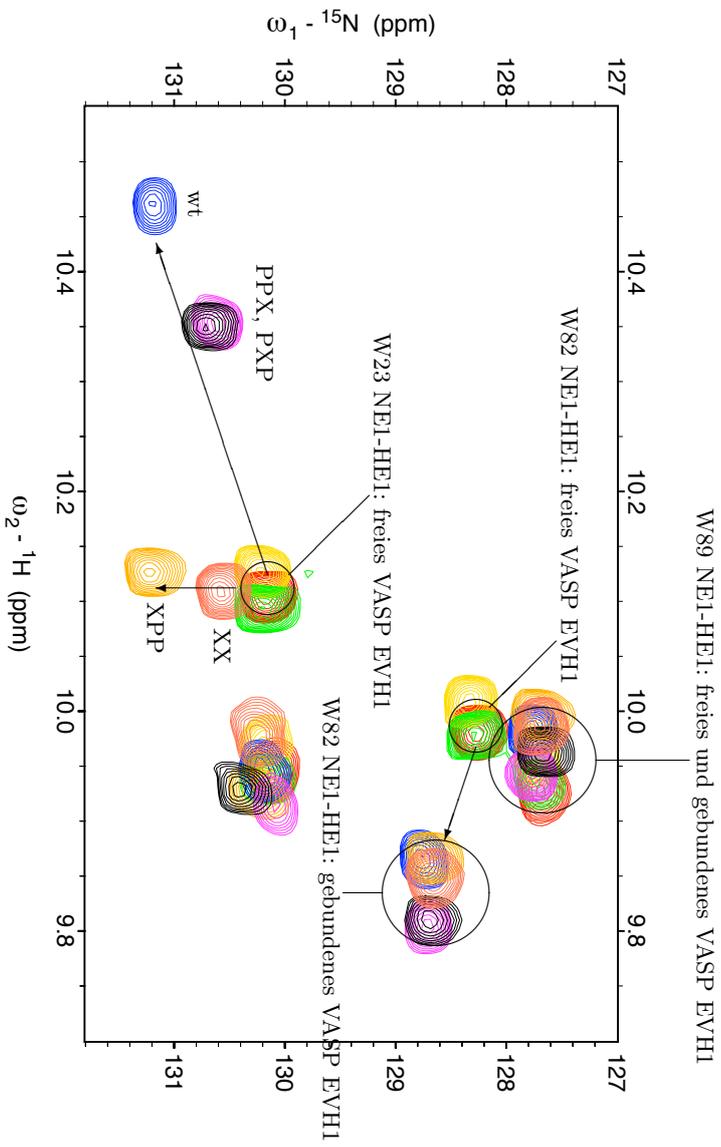


Abbildung 13.6.: Chemische Verschiebung der NE1-HE1 Wechselwirkung der drei Trp des VASP EVH1 bei den verschiedenen X enthalteneen Liganden und dem ActA-Peptid.

Ligand untersucht, der die beste Ersetzung der Proline mit dem X-Baustein und des bindungsentscheidenden Phenylalanins mit 2Cl-Phe enthielt (siehe Tab. 20.6, 20.7). Wir fanden dabei für die FT keinen Unterschied in der Affinität zum bestbindenden Liganden aus Tab. 20.11, jedoch fanden wir einen Unterschied in der ITC. Dabei zeigte sich, dass der Unterschied in der Affinität zwischen der FT und der ITC nivelliert wurde, im Gegensatz zum bestbindenden Liganden aus Tab. 20.11. Allerdings konnten wir nur einen ITC-Datensatz mit der ITC200 aufnehmen, die bestimmte Messunsicherheit ist daher wahrscheinlich eine zu optimistische Schätzung. Sollte sich die beobachtete Differenz aber auch nach weiteren Messungen als statistisch signifikant erweisen, dann würde der Spir2-Baustein die ITC- $K_D$  und die FT- $K_D$  wieder annähern, was sich so interpretieren liesse, dass die beobachteten Prozesse in der ITC sich eher um das Trp23 abspielen, wie wir es ja exklusiv in der FT beobachten.



# 14. Ersetzungen des bindungsentscheidenden Phenylalanins des ActA-Peptids

Bisher haben wir nur die Proline zu ersetzen gesucht und wollen nun das bindungsentscheidende Phenylalanin des ActA-Liganden mit unnatürliche Aminosäuren austauschen, in der Hoffnung die Affinität weiter zu erhöhen.

Nachfolgend zeigen wir, dass die unnatürliche Aminosäure 2-Chlor-L-Phenylalanin (2-Chlor-Phenylalanin; 2Cl-Phe) als Ersatz für das zweite Phenylalanin die Affinität am stärksten erhöht. In Kombination mit dem X-Baustein erhalten wir damit erstmalig einen Liganden der im nanomolaren Bereich an VASP-EVH1, Enah- und EVL-EVH1 bindet.

## 14.1. Spotarrays zur Ersetzung des bindungsrelevanten Phenylalanins

Aus der Arbeit von Ball et al. [9] ist bereits bekannt, dass das zweite Phenylalanin des ActA-Peptids praktisch nur durch Tryptophan ersetzt werden kann. Um weitere unnatürliche Aminosäuren als mögliche Ersetzung dieses Phenylalanins zu finden, verwendeten wir einen Spotarray mit folgenden Sequenzen: (P1) SFE-Z-PPPPTTEDEL-( $\beta$ -Ala) und (P2) Z-PPPPTTEDEL-IMR-( $\beta$ -Ala). Der Rest Z bedeutet hierbei eine natürliche oder unnatürliche Aminosäure. Unsere Auswahl an unnatürlichen Aminosäuren deckt Derivate des Phenylalanins, des Tryptophans und des Leucins ab. Aus technischen Gründen müssen alle Peptide die gleiche Länge haben, deswegen wurden die Verkürzungen um die entsprechenden Aminosäuren aus der ActA-Sequenz verlängert. Die N-terminale Verkürzung des ActA-Peptids für die P2-Sequenz bedeutet einen Verlust an Affinität und damit eine Verschärfung der Selektionsbedingungen für die unnatürlichen Aminosäuren.

Die Ergebnisse sind in Abb. 14.1 dargestellt. Für P1 lassen sich eine ganze Reihe an unnatürlichen Aminosäuren finden, die zu einer Bindung an VASP-EVH1-GST führen. Verkürzen wir N-terminal und verringern so die Affinität, bleiben für P2 zwei unna-

türliche Aminosäuren übrig: 2-Chlor-L-Phenylalanin und L-(1-Naphthyl)alanin (kurz: 1-Naphtylalanin; 1-Nal).

## 14.2. Ohne Ersetzungen der Proline mit X

In Tab. 20.8 sind die Ergebnisse der Bindungsstudien zur Ersetzungen für das zweite Phenylalanin zusammengefasst. Wir können das Phenylalanin mit Tryptophan, 2-Chlor-Phenylalanin und 1-Naphtylalanin austauschen und erhalten höhere Affinitäten, im Vergleich zum Referenzpeptid. Für Tryptophan, 1-Naphtyl- und 2-Naphtylalanin erhielten wir in der ITC nach jeder Injektion von Ligand eine sehr langsame Rückkehr ins Gleichgewicht.

**Bindungsdaten Fluoreszenz** Für den Trp enthaltenen Liganden (Trp-ActA-Peptid) wurde Acrylamid zur Quenchung des Ligandensignals verwendet. Da die Zugänglichkeit des Trp des Liganden für Acrylamid weit höher ist, als für die Trp des VASP-EVH1, bzw. als für die Trp im Protein-Ligand-Komplex, reduzieren wir damit den gemessenen Hintergrund (siehe auch Abb. 14.2 und [72]). Allerdings konnten wir dann die Normierung der Intensität für die CVM anhand von (9.18) nicht durchführen, da die Differenz  $[F(\phi = 1) - F(\phi = 0)]$  sehr klein war und damit der Fehler in der Normierung stark stieg. Wir bildeten stattdessen den Median über alle Werte der reduzierten Intensität  $\Delta F$  für jede einzelne CVM-Titration des Trp-ActA-Peptids und verwendeten diesen Wert für zur Normierung.

Die Regression für den Trp-ActA-Liganden war bei der Verwendung aller Datenpunkte und (9.21) nicht durchführbar. Ohne den Datenpunkt bei  $\phi = 0,9$  und mit (9.21) war der  $p$ -Wert für den Parameter  $P_{\text{ads}}$  25 %, d. h. dieser Parameter war vernachlässigbar. Daher führten wir die Regression des Trp enthaltenen Liganden ohne  $P_{\text{ads}}$  und ohne den Datenpunkt bei  $\phi = 0,9$  durch.

Wie wir in der ITC für den Trp-ActA-Liganden feststellen mussten, kehrt die Reaktion nach der Injektion des Liganden nur langsam in das Gleichgewicht zurück. In dieser Hinsicht war es ein glücklicher Umstand, dass wir für die CVM die Messlösung für jeden Datenpunkt bereits mindestens 10 min vor der Messung vorzuliegen hatten, so dass sich das Gleichgewicht einstellen konnte.

Für die anderen beiden Liganden (2Cl-Phe)- und (L-Cha)-ActA-Peptid wurde statt der CVM eine FT durchgeführt. Der Hintergrund, den die Liganden (2Cl-Phe)- und (L-Cha)-ActA-Peptid in der FT liefern, konnten vernachlässigt werden. Für den (2Cl-Phe)-ActA-Ligand konnten wir (8.5) verwenden und hatten daher drei anzupassende

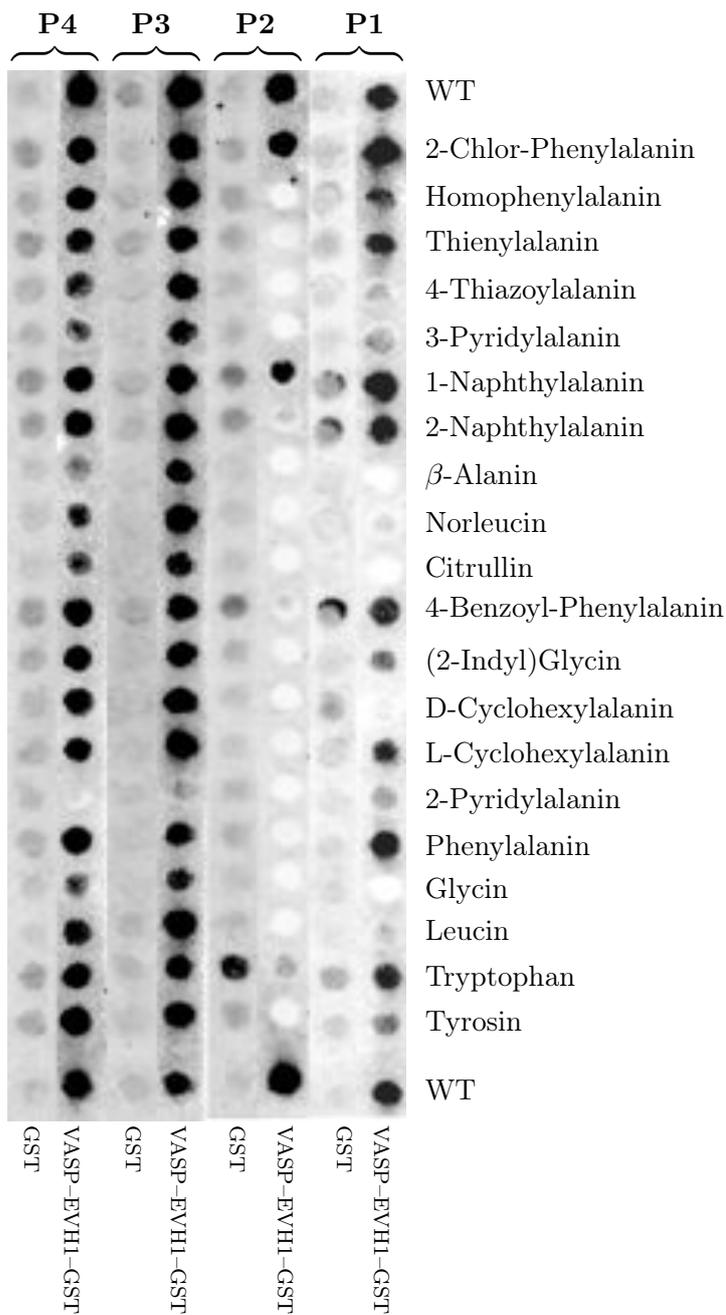


Abbildung 14.1.: Ersetzungen für Acta-Peptid. Es wurden L-Aminosäuren verwendet, wenn nicht anders angegeben.

WT: SFEFPPPTEDEL-( $\beta$ -Ala)-Membran,  
**P1**: SFE-**Z**-PPPTEDEL-( $\beta$ -Ala)-Membran,  
**P2**: **Z**-PPPTEDELIMR-( $\beta$ -Ala)-Membran,  
**P3**: SFEFPPPTEDE-**Z**-( $\beta$ -Ala)-Membran,  
**P4**: SEPSSFEPFPPP-**Z**-( $\beta$ -Ala)-Membran

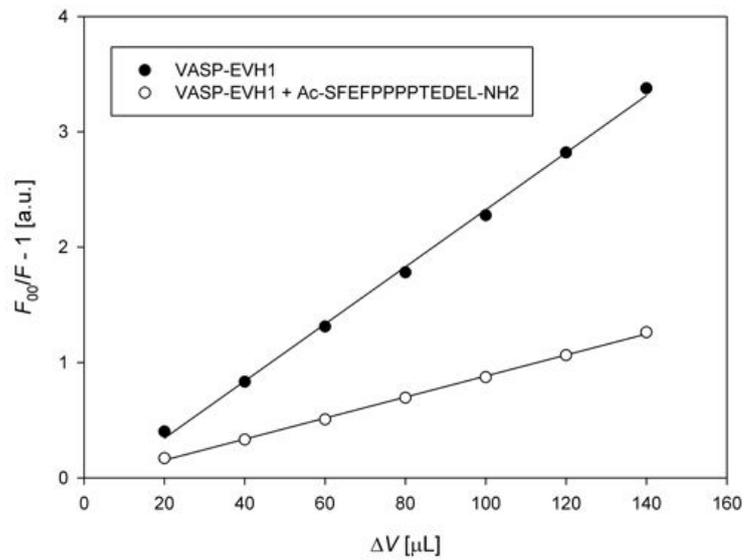


Abbildung 14.2.: Stern-Volmer-Plot für das freie VASP-EVH1 und für VASP-EVH1 und das ActA-Peptid, unter Berücksichtigung des Verdünnungseffekts (siehe Gleichung(9.26)). Durch die Zugabe des Liganden nimmt die Stern-Volmer-Konstante ab. Das weist zum einen auf eine Bindung des Liganden hin, zum anderen das ein Großteil der beobachteten Fluoreszenzintensität vom Trp23 getragen wird, welches an der Bindung beteiligt ist.

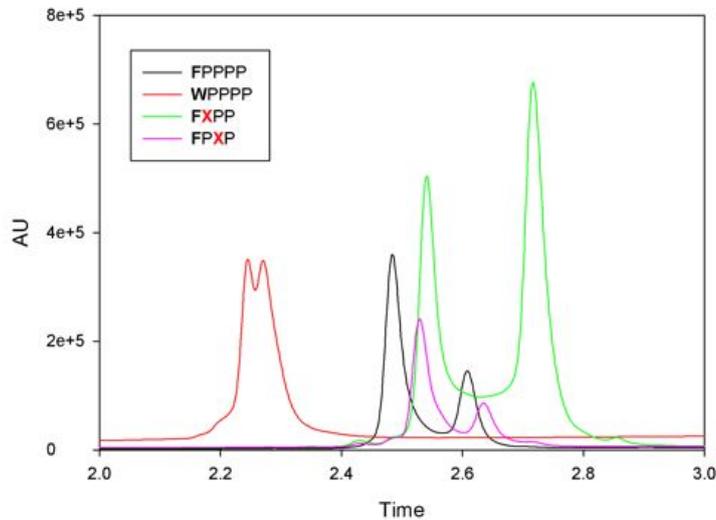


Abbildung 14.3.: LC-Daten aus der LCMS für Derivate des ActA-Peptids für VASP-EVH1. Die Massen der Peaks sind gleich, d. h. es liegen cis-trans Isomere der Peptide vor.

Parameter:  $K_D$ ,  $\delta$  und  $M$ . Die Werte für  $Q$  und  $P$  stiegen durch die Verwendung von  $M$  von 0,177 bzw. 0,115 auf 0,999 bzw. 0,980. Ausserdem blieben der  $p$ -Wert für die anzupassenden Parameter deutlich unter 0,001 %, wenn  $M$  verwendet wird.

**Bindungsdaten ITC** Für den (2-Nal)-ActA-Ligand mussten wir feststellen, dass das Protein ausfiel und die Lösung teilweise gelb wurde. Die gelbe Lösung ließ sich durch Zentrifugierung trennen und das ausgefallene Protein war weiß.

Für die Datenfits wurden (8.5) verwendet. Die Titration für Trp-, (1-Nal)-, (2-Nal)- und (L-Cha)-ActA-Ligand zeigte eine sehr langsame Rückkehr zum Gleichgewicht. So war der Abstand zwischen zwei Titrationsen bis zu 25 min lang.

**Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit für die Umfaltung der nichtbindenden in die bindende Konformation des Trp-ActA Liganden mittels ITC** Zur Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit bzw. der Zeitkonstante der Umfaltung in die bindende Konformation des Trp-ActA Liganden injizierten wir eine gewisse Menge Ligand in die ITC-Zelle, die die VASP-EVH1 Lösung enthielt (siehe Abb. 14.4). Nach der Injektion war die Konzentration des Liganden ca.  $30 \mu\text{M}$  und des Proteins ca.  $100 \mu\text{M}$ . Mit der ermittelten  $K_D$  von ca.  $4 \mu\text{M}$  (siehe Tab. 20.8) sollten daher ca. 95 % aller Liganden im Protein-Ligand-Komplex vorliegen. Da der Anteil an bindungsfähigem Ligand an der

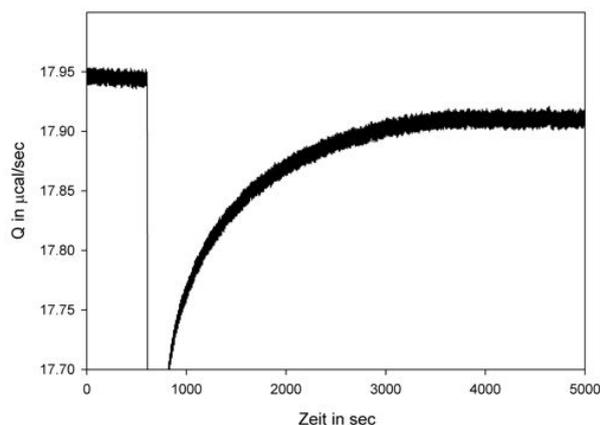


Abbildung 14.4.: Ausschnitt aus dem Thermogramm nach der Injektion des Liganden Ac-SFEF-W-PPPTEDEL-NH<sub>2</sub> zur VASP-EVH1 Lösung. Die Heizleistung  $q$  kehrt nur langsam in das Gleichgewicht zurück. Das Rauschen ist auf eine Störung der ITC-Baseline durch ein niederfrequentes Signal zurückzuführen.

Gesamtmenge nicht 100 % betragen wird, wäre dass aber auch nur eine untere Grenze.

Der Zeitverlauf nach der Injektion wurde so lange verfolgt, bis ein Plateau erreicht wurde (siehe Abb. 14.4). Für den anzupassenden Datensatz verwendeten wir den  $q$ -Verlauf ab der Injektion, wobei wir die ersten 206 sec verwarfen, da hier zum einen die Injektion und zum anderen die Einstellung des Mischungsgleichgewichtes stattfinden.

Als Modell verwendeten wir (10.22), wobei wir für  $q_0$  eine einfache lineare Abhängigkeit annahmen:  $q_0 = m t + n$ . Die Anpassung des Modells an die Daten zeigte, dass wir mit 582 sec mehr als die anfänglichen 206 sec verwerfen mussten, um eine zufällig Verteilung der Reste des Datenfits zu erreichen (siehe Abb. 14.5). Dabei muss berücksichtigt werden, dass auch ohne die konformationelle Umfaltung des Liganden eine gewisse Zeit vergeht, bis das thermische Gleichgewicht nach einer Injektion erreicht ist. In dem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass bei einer Injektion von 10  $\mu\text{L}$  min. 360 sec bis zum Erreichen des thermischen Gleichgewichtes vergehen, wie z. B. für das ActA-Peptid. Bei dieser Messung wurde aber ein Injektionsvolumen von 35  $\mu\text{L}$  verwendet, die Einstellung des thermischen Gleichgewichtes der Protein-Ligand-Mischung vor der Sichtbarwerdung der Umfaltungskinetik des Liganden sollte daher natürlich länger dauern.

Der vier verwendeten Parameter  $A$ ,  $k$ ,  $m$  und  $n$  des Modells (10.22) waren alle für die Regression signifikant. Die uns interessierenden Umfaltungsgeschwindigkeit wurde zu  $k = 9,7(0,3) \times 10^{-4} \text{ 1/sec}$  bestimmt. Die Halbwertszeit (10.23) der Umwandlung

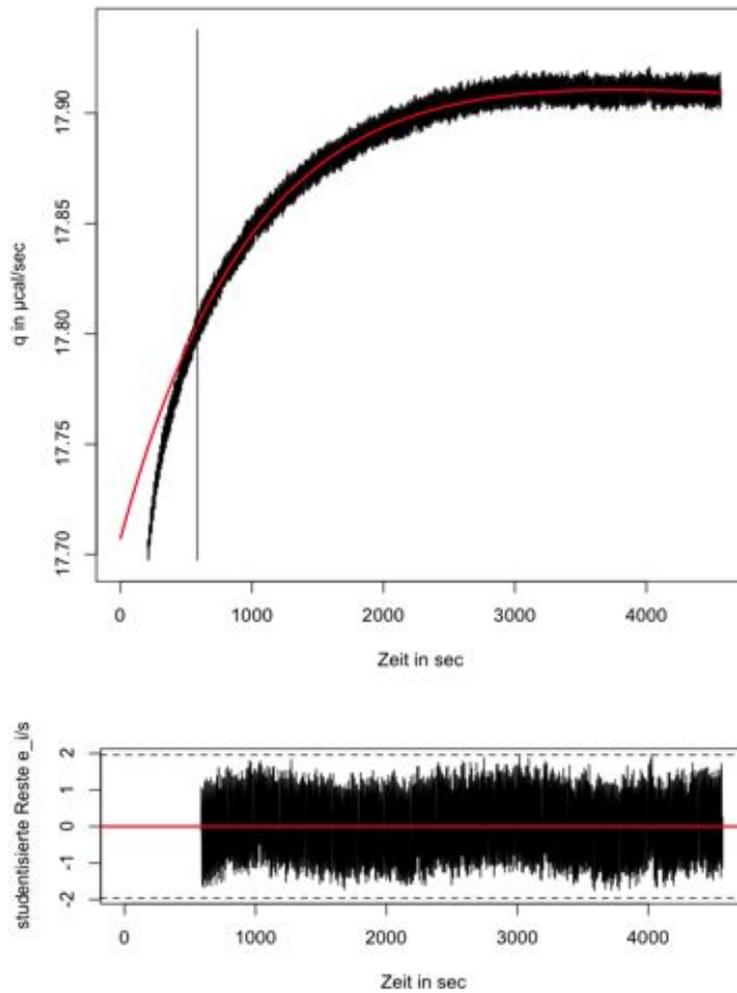


Abbildung 14.5.: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit für die Umfaltung der nicht-bindenden in die bindende Konformation des Trp-ActA Liganden. Oben ist die angepasste Kurve (rot) und die verwendeten Daten (schwarz) abgebildet. Für den Datenfit wurden nur die Daten ab der vertikale Linie verwendet. Unten ist die Anpassung der Daten an das Modell abgebildet.

des Liganden von der nichtbindenden in die bindende Konformation lag also bei ca. 710 (20) sec.

**Einfluss der Messunsicherheiten für  $P_{\text{f}}^{\circ}$  und  $L_{\text{f}}^{\circ}$  auf den Unterschied in  $\Delta\Delta G$**  Die Betrachtung des Einflusses der unbekanntenen Messunsicherheiten für die Protein- und die Ligandenkonzentration auf die beobachtete Differenz  $\Delta\Delta G$  für die Ersetzungen des bindungsentscheidenden Phenylalanins sind in Tab. 20.10 zusammengefasst. Hierbei fällt auf, dass der Unterschied in der Affinität für Trp und (2Cl-Phe) weder für die FT, noch für die ITC signifikant war. Der Grund ist vermutlich die nicht ausreichende Messgenauigkeit in der Bestimmung der freien Enthalpie.

**Kation- $\pi$  Wechselwirkung** Wir untersuchten die Kristallstruktur 1evh des Komplexes von Enah-EVH1 mit Ac-FPPPT-NH<sub>2</sub> [93] mittels des Programms **Capture**<sup>1</sup> [43] auf mögliche Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen. Es wurden zwei Wechselwirkungen gefunden: Eine intramolekulare für die Enah-EVH1-Domäne, und eine intermolekulare zwischen dem bindungsentscheidenden Phenylalanin des Peptids und dem Arg81 der Domäne. Die Ergebnisse sind in Tab. 14.1 zusammengefasst.

### 14.3. Mit Ersetzungen der Proline mit X

In Tab. 20.11 sind die Ergebnisse der Bindungsstudien zur Ersetzungen für das zweite Phenylalanin und die Ersetzungen für Pro-Pro Motive mit dem Diprolinbaustein zusammengefasst. Ersetzen wir das zweite Phenylalanin mit 2-Cl-Phe und die letzten beiden Proline mit dem Diprolinbaustein erhalten wir einen nanomolaren Binder.

**Bindungsdaten Fluoreszenz** Für die Titration des Liganden Ac-SFE(2Cl-Phe)PPX-TEDEL-NH<sub>2</sub> ((2Cl-Phe)PPX) ist der  $Q$ - und  $P$ -Wert für das Modell 8.2 null. Auch zeigte die Verteilung der Reste an, dass das Regressionsmodell nicht ausreichend war (siehe Abb. 14.6). Es wurde daher das Modell 8.5 verwendet, d. h. die Ligandenkonzentration floß als anzupassender Parameter in die Regression mit ein. Wir gingen dabei davon aus, dass wir die Proteinkonzentration mittels UV/Vis-Absorption hinreichend genau bestimmen konnten. Durch die Verwendung des Modells 8.5 verringerte sich die  $K_{\text{D}}$  von ca. 2,8  $\mu\text{M}$  (Modell 8.2) auf ca. 0,3  $\mu\text{M}$  (Modell 8.5). Der Hintergrund der FT-Messung konnte vernachlässigt werden.

---

<sup>1</sup><http://capture.caltech.edu/>

Kation	AS-Nr.	Substruktur	Pi	AS-Nr.	Substruktur	E(es) kJ/mol	E(vdw) kJ/mol
Arg	10	Protein	Phe	32	Protein	-20,7	-12,0
Arg	81	Protein	Phe	1001	Ligand	-16,3	-14,1

Tabelle 14.1.: Ergebnis des Capture-Programms für die Kristallstruktur 1evh des Komplexes von Enah-EVH1 mit Ac-FPPPT-NH<sub>2</sub>. Es wurden zwei Kation- $\pi$  Wechselwirkungen gefunden, wobei eine zwischen dem Protein und dem Liganden wirkt.

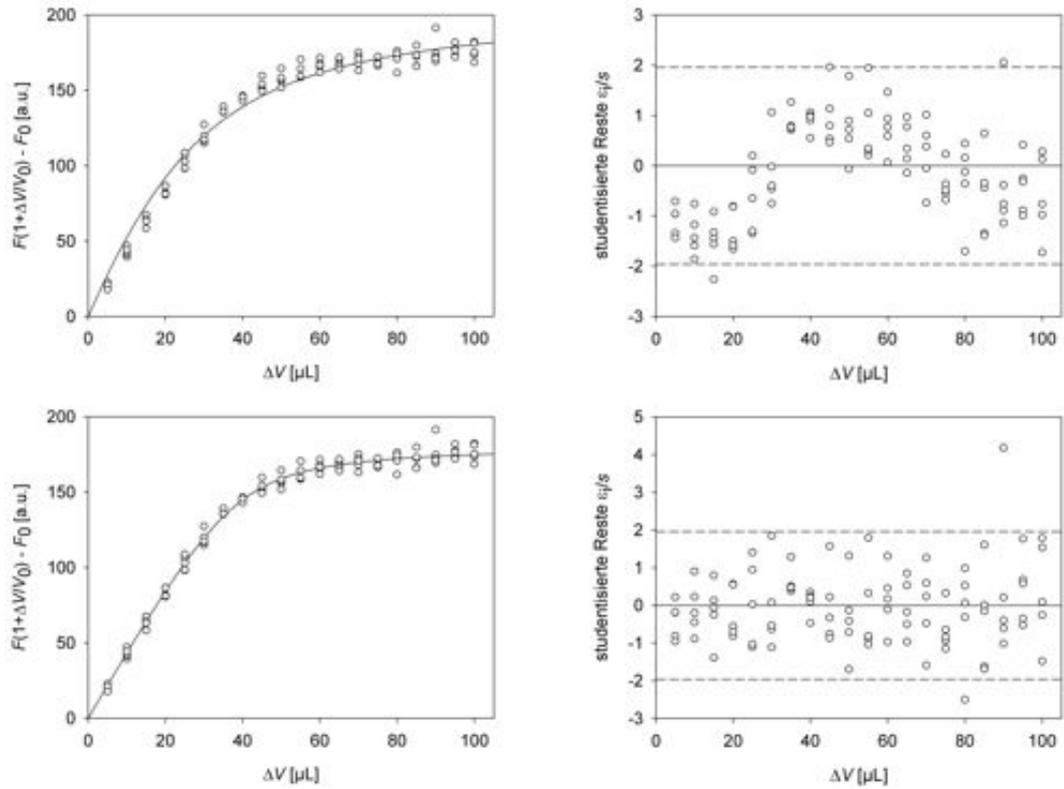


Abbildung 14.6.:  $M$  oder nicht  $M$ : Auf der *linken* Seite befinden sich die Plots der gefitteten Kurve und der Messdaten. Auf der *rechten* Seite sind die Studentisierten Reste  $\varepsilon_i/s$  gegen das kumulierte Titrationsvolumen  $\Delta V$  aufgetragen. *Oben* befinden sich die Ergebnisse des Datenfits ohne  $M$  nach Modell 8.2. Die Werte  $Q$  und  $P$ , die die Qualität des Fits anzeigen, waren null. Auch zeigen die studentisierten Reste (*oben rechts*), dass das Modell 8.2 die Daten nicht vollständig beschreiben kann. *Unten* sind die Ergebnisse des Datenfits mit  $M$  (Modell 8.5) dargestellt. Sowohl die Werte  $Q = 0,993$  und  $P = 0,937$ , als auch die studentisierten Reste, zeigen, dass das Modell 8.5 die Daten hinreichend beschreiben kann. Die ermittelte  $K_D$  verringert sich von  $2,8 \mu\text{M}$  (Modell ohne  $M$ ) auf  $0,3 \mu\text{M}$  (Modell mit  $M$ ).

Der WPPX- und (2Cl-Phe)PPX-Ligand banden besser an VASP-EVH1, als der FPPX-Ligand (siehe Tab. 20.11 und 20.12). Wegen der hohen Messunsicherheit der  $\Delta G^\circ$  für den Trp-Liganden konnten wir keinen Unterschied in der Affinität zwischen dem Trp- und (2Cl-Phe)PPX-Liganden feststellen. Der (2Cl-Phe)PPX-Ligand band jedoch statistisch signifikant im nanomolaren Bereich an VASP-EVH1, die anderen verwendeten Liganden nicht.

**Bindungsdaten ITC** Für den WPPX-Liganden war in der ITC nach der Injektion des Liganden zum Protein wieder eine sehr langsame Rückkehr ins Gleichgewicht beobachtbar. Alle anderen verwendeten Liganden zeigten dieses Verhalten nicht.

In der ITC bestätigte sich das Ergebnis der fluoreszenzbasierten Titrationsmethoden, dass der WPPX- und der (2Cl-Phe)PPX-Ligand besser an VASP-EVH1 banden, als der FPPX-Ligand (siehe Tab. 20.11 und 20.12). Nach den Ergebnissen der ITC band der (2Cl-Phe)PPX-Ligand mit höherer Affinität, als der Trp-Ligand. Zusätzlich band auch der (2Cl-Phe)XX-Ligand mit der vollständigen Ersetzung der Proline mit dem X-Baustein mit einer knapp im nanomolaren Bereich liegenden  $K_D$ .

**Vergleich der Bindungsdaten für FT und ITC** Analog zur beobachteten Differenz  $\Delta\Delta G$  für die CVM und ITC für die FPPX-Chimäre (siehe Tab. 20.3), konnten wir auch für die FT und die ITC der (2Cl-Phe)PPX-Chimäre eine Differenz entdecken (siehe Tab. 20.12). Dabei bindet auch die (2Cl)PPX-Chimäre für die fluoreszenzbasierten Methode besser als für die ITC, wie wir es bereits für die FPPX-Chimäre beobachtet hatten (siehe Tab. 20.2 und 20.3).

**Einfluss der Messunsicherheiten für  $P_i^\circ$  und  $L_i^\circ$  auf den Unterschied in  $\Delta\Delta G$**  Für den Trp-haltigen Liganden WPPX wurde für die fluoreszenzbasierten Titrationsmethoden nur eine geringe bis keine Signifikanz für die gefundene Differenz  $\Delta\Delta G$  zur die FPPX- und (2Cl-Phe)PPX-Chimäre gefunden, im Gegensatz zu den ITC-Daten (siehe Tab. 20.13). Der Grund liegt hier wahrscheinlich in der höheren Messgenauigkeit für die Schätzung der freien Enthalpie des WPPX-Liganden für die CVM-Daten.

Der (2Cl-Phe)PPX- und (2Cl-Phe)XX-Ligand banden auch noch bei einem Fehler von 20% für die Protein- und die Ligandkonzentration besser an VASP-EVH1, als der FPPX-Ligand. Auch konnte der Affinitätsunterschied des (2Cl-Phe)PPX-Liganden für die FT und ITC bestätigt werden.

**Schmelzkurven** Wir untersuchten den Einfluss des ActA-Peptids und des (2Cl-Phe)PPX-Liganden auf die Stabilität des VASP-EVH1 mittels CD und DSC. Die DSC-Schmelzkurven wurden im Labor von Prof. Dr. Sandro Keller aufgenommen. Die Ergebnisse für die CD und DSC sind in Abb. 14.7 wiedergegeben. Die Konzentration der beiden Liganden war gleich.

Der beobachtete Unterschied in der Schmelztemperatur für die CD und DSC ist wohl auf einen systematischen Fehler in der CD zurückzuführen: Der Temperaturmessfühler zeigte die Temperatur des Küvettenhalters, aber nicht die Temperatur der Lösung in der Küvette an.

Für beide Experimente zeigte sich das gleiche Bild: Das ActA-Peptid und der (2Cl-Phe)PPX-Ligand erhöhten die Schmelztemperatur des VASP-EVH1, wobei der (2Cl-Phe)PPX-Ligand mit ca. 8°C einen höheren Einfluss hatte, als das ActA-Peptid (4°C Erhöhung).

**Vergleich für den bestbindenden Liganden zwischen VASP-EVH1, Enah-EVH1, EVL-EVH1** Für den bestbindenden Liganden (2Cl-Phe)PPX wurden auch die Affinitäten für die Enah- und die EVL-EVH1-Domäne bestimmt, und er band an diese Domänen ebenfalls mit nanomolarer Affinität (siehe Tab. 20.14).

Der *Q*- und *P*-Wert für Enah-EVH1 und EVL-EVH1 für die FT mit dem Modell 8.2 war null und die Verteilung der Studentisierten Reste zeigte eindeutig keine gleichmässige Verteilung, sondern eine Tendenz, so wie es auch für VASP-EVH1 beobachtet hatten (siehe Abb. 14.6). Ebenfalls wie für VASP-EVH1 konnte durch die Verwendung des Modells 8.5 das Problem behoben werden.

Der Hintergrund hatte keinen Einfluss auf die Messung für alle drei getesteten Proteine. Für die FT war kein Unterschied in der Affinität zwischen den Domänen erkennbar, jedoch für die ITC. So scheint der (2Cl-Phe)PPX-Ligand an Enah- und EVL-EVH1 mit höherer Affinität zu binden, als an VASP-EVH1 (Vergleiche Konfidenzintervalle in Tab. 20.14). Da wir aber für Enah- und EVL-EVH1 nur einen Datensatz aufnehmen konnten und der Unterschied klein war, verzichteten wir auf eine Angabe von  $\Delta\Delta G$  und der Durchführung der MC für die erweiterten Messunsicherheiten.

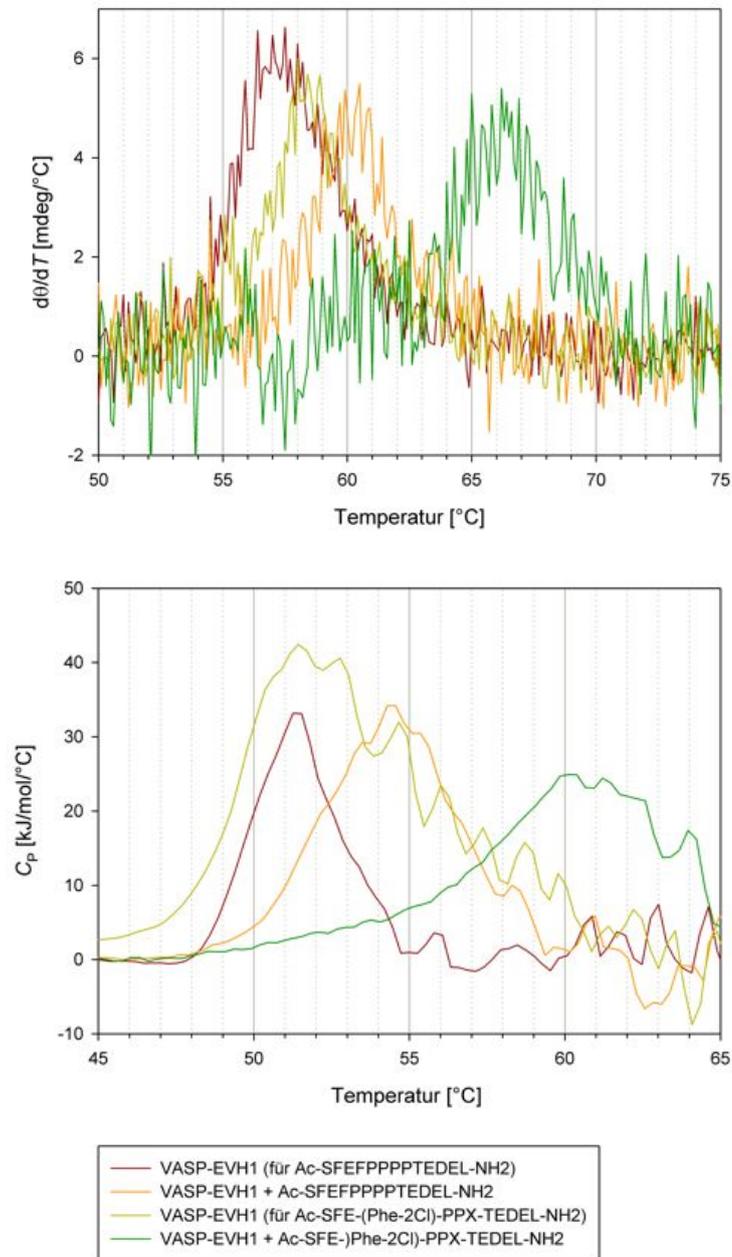


Abbildung 14.7.: Erste Ableitung des CD-Signals nach der Temperatur (oben) und DSC-Ergebnis (unten).



# 15. Behandlung der flankierenden Epitope des ActA-Peptids

Nachdem wir die Proline und das bindungsentscheidende Phenylalanin mit einem Affinitätsgewinn ersetzen konnten, wenden wir uns nun den flankierenden Epitopen zu, d. h. den Teilen des ActA-Peptids, die sich um das Kernmotiv FPPPP befinden. N-terminal ist das der Ac-SFE- und C-terminal der TEDEL-NH<sub>2</sub>-Rest. Wir haben versucht diese beiden Epitope zu verkürzen und/oder zu modifizieren. Die Verkürzungen führten zu Affinitätsverlusten, die Modifizierungen jedoch nur zu moderaten Affinitätsgewinnen. Wir konnten jedoch den Liganden auf das (modifizierte) Kernmotiv verkürzen und erhielten dabei immer noch eine Affinität, wie für das ActA-Peptid. Das ist wesentlich besser, als die hohe dreistellige  $K_D$  des Peptids Ac-FPPPPPT-NH<sub>2</sub> an VASP- und Mena-EVH1, so wie sie von Ball et al. [9] und Prehoda et al. [93] bestimmt wurde.

## 15.1. Behandlung des N-terminalen Epitops

### 15.1.1. Verkürzungen des N-terminalen Epitops

Das N-terminale Epitope Ac-SFE wurde sukzessiv verkürzt, bis nur noch der freie N-Terminus des bindungsentscheidenden Phenylalanins vorlag (siehe Tab. 20.15, 20.16 und 20.17). Das N-terminale Epitop hatte einen Einfluss auf die Affinität, wobei besonders der Affinitätsverlust des freien gegenüber dem acetylierten N-Terminus – des um Ac-SFE verkürzten Peptides – auffiel.

**Bindungsdaten Fluoreszenz** Die CVM ohne Berücksichtigung der Proteinadsorption  $P_{ads}$  lieferte für das amidierete und nichtamidierete, und um die ersten drei Aminosäuren SFE verkürzte Peptid  $P$ -Werte unter 5% . Erst mit der Verwendung von  $P_{ads}$  war die Qualität des Datenfits ausreichend.

Es fiel besonders der starke Affinitätsverlust für das um Ac-SFE verkürzte Peptid mit dem freien N-Terminus auf, da wir hier ca. 6 kJ/mol für  $\Delta G^\circ$  verloren. Aber auch das um Ac-SFE verkürzte und acetylierte Peptid band schlechter als das ActA-Peptid.

**Bindungsdaten ITC** Wir konnten die, über die CVM ermittelte, Verringerung der Affinität durch die Reduktion um das Ac-SFE-Epitop bestätigen. Allerdings ist die Verringerung in  $\Delta G^\circ$  hier kleiner als für die CVM.

**Einfluss der Messunsicherheiten für  $P_t$  und  $L_t$  auf den Unterschied in  $\Delta\Delta G$**  Die Ergebnisse der Monte-Carlo-Simulation sind in Tab. 20.16 zusammengefasst.

Die Erhöhung der Affinität des um Ac-SFE verkürzten und acetylierten Peptids gegenüber dem ActA-Peptid war auch noch bei einem Fehler von 20 % für die Protein- und Ligandkonzentration sowohl für die CVM als auch die ITC signifikant.

Der Unterschied in der Affinität zwischen den beiden um Ac-SFE verkürzten Peptiden, die entweder acetyliert oder einen freiem N-Terminus hatten, bleibt nur dann signifikant, wenn der Fehler der Ligandkonzentration unter 20 % bleibt.

### 15.1.2. Ersetzungen für das N-terminale Epitops

Wir modifizierten das N-terminale Epitop durch Ersetzung des Acetyl-Restes mit einem Dansyl-Rest und gleichzeitiger Verkürzung des Epitops. Es zeigte sich, dass die dansylierten verkürzten ActA-Peptide, im Gegensatz zu den undansylierten Verkürzungen, mit etwa der gleichen Affinität, wie das ActA-Peptid selbst banden (siehe Tab. 20.18). Die Erhöhung war aber nur moderat.

Wir konnten mit den dansylierten Peptiden die Trp-Fluoreszenz des VASP-EVH1 sehr gut löschen, wodurch wir ein sehr gut messbares System für die FT erhielten: Wir konnten prinzipiell als messbaren Signalbereich die Differenz zwischen maximaler Fluoreszenz (Protein ohne Quencher, Einstellung des Fluoreszenzspektrometers so, dass das höchste sinnvoll nutzbare Signal erreicht wurde) und der Intensität des vollständig gequenchten Proteins (faktisch null) ausnutzen, was das Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf den praktisch kleinstmöglichen Wert des Messproblems verringerte. Dabei kam allerdings bereits der Filtereffekt zu tragen (siehe Seite 58). Positiv war auch die Möglichkeit die Konzentration der dansylierten Peptide mittels UV/Vis bestimmen zu können

Wir variierten den Dansylrest durch die Verwendung eines 1-, bzw. 2-Naphtylsulfon-yl-, Benzoylsulfonyl- und eines Fmoc-Restes (siehe Tab. 20.20). Dabei zeigte sich, dass der Fmoc-Rest die Affinität von allen Modifizierungen am stärksten verbesserte. Da der Fmoc-Rest ist sehr groß, deshalb verfolgten wir diesen Weg nicht weiter, da wir das Molekulargewicht des Liganden verringern wollten.

Wir verwendeten den Benzoylsulfonyl-Rest und 2Cl-Phe als Ersetzung des bindungsnettscheidenden Phenylalanins und verglichen ihn mit einem 2Cl-Phe-haltigen aber sonst nur acetylierten Liganden (siehe Tab. 20.21). Die beiden 2Cl-Phe enthaltenen Liganden

liessen sich zwar auch mit dem Modell 8.5 fitten, wodurch sich die  $K_D$  halbierte. Gleichzeitig vergrösserten sich aber auch die dazugehörenden Konfidenzintervalle so, das es keinen statistisch signifikanten Unterschied zu den Ergebnissen gab, wie sie in Tab. 20.21 mit dem Modell 8.2 ermittelt wurden. Letzlich hatte der Benzoylsulfonyl-Rest keinen Einfluß auf die Affinität. Es stellt sich die Frage, ob der Unterschied der Messmethoden für die Benzoylsulfonyl-Liganden in Tab. 20.20 (ITC) und Tab. 20.21 (FT) für den unerwarteten fehlenden Unterschied in der Affinität des des 2Cl-Phe und Benzoylsulfonyl enthaltenen Liganden verantwortlich scheint. Diese Frage muss hier unbeantwortet bleiben.

## 15.2. Behandlung des C-terminalen Epitops

### 15.2.1. Einfluss der Ladung am C-terminalen Leucin

Wir untersuchten den Einfluss der Amidierung des C-Terminus auf die Bindung des ActA-Peptids, wobei wir einen schwachen Einfluss der Amidierung auf die Affinität feststellen konnten (siehe Tab. 20.22, 20.23, 20.24). Interessant ist dies im Zusammenhang mit den von Zimmermann et al. [121] ermittelten  $K_D$  für das ActA-Peptid und das Trp-ActA-Peptid mittels Biacore und einer NMR-Titration. Dort waren die ermittelten Affinitäten stets grösser als die hier ermittelten, was wir auf fehlende Acetylierung/Amidierung (vor allem durch letztere) der von Zimmermann et al. verwendeten Peptide zurück führen.

### 15.2.2. Ersetzungen für das C-terminale Epitop

Die von Ball et al. [9] durchgeführte Substitutionsspotarray und die Verkürzungen des ActA-Peptids machen klar, dass das C-terminale Epitop zur Affinität beiträgt, wobei das C-terminale Leucin womögliche eine besondere Bedeutung haben könnte. Wir suchten nun das Epitop durch natürliche und unnatürliche Aminosäuren zu ersetzen, um einerseits die Affinität des Liganden zu erhöhen, und andererseits den Liganden zu verkürzen. Dazu wurde, wie schon für das bindungsentscheidende Phenylalanin, ein Spotarray durchgeführt, wobei wir zwei Sequenzen verwendeten, (P3) SFEFPPPTEDE-Z-( $\beta$ -Ala) und (P4) SEPSSFEPPPP-Z-( $\beta$ -Ala), wobei Z die zu ersetzende Aminosäure markiert (siehe Abb. 14.1, aus technische Gründen mussten alle Sequenzen des Spotarrays die gleiche Länge haben, deswegen ist die P4-Sequenz um weitere Aminosäuren aus dem ActA-Protein verlängert). Dabei zeigte sich, dass wir fast jede eingesetzte Aminosäure verwenden konnten. Allerdings war wenigstens die Ausgangssequenz P3 ungünstig gewählt, da zum einen die Affinität der P3-Sequenz bereits kleiner als die Cut-off- $K_D$

des Spotarrays war, d. h. die Spots der Ausgangssequenz führten bereits zu schwarzen Spots. Jede weiterer Erhöhung der Affinität lässt daher das Signal unverändert. Gleichzeitig erzeugen Ersetzungen, die eine Verringerungen der Affinität zur Folge haben, nicht notwendigerweise weiße Spots, da sich dafür die Affinität massiv verschlechtern müsste, um die Cut-off- $K_D$  des Spotarrays zu überschreiten. Wir wählten dennoch aus dem Spotarray für die P4-Sequenz eine Reihe von Aminosäuren als Ersetzung des gesamten C-terminalen Epitops aus. Um den zu erwartenden Affinitätsverlust auszugleichen, wählten wir Trp als Ersetzung des bindungsentscheidenden Phenylalanins, da wir bereits zu diesem Zeitpunkt wussten, dass Trp die Affinität erhöht (Die Affinitätssteigerung durch 2Cl-Phe war zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt). Die Ergebnisse sind in Tab. 20.25 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die eingesetzten Variationen gegenüber dem Threonin nur einen moderaten Effekt auf die Affinität hatten.

**Bindungsdaten FT** Um das Fluoreszenzsignal des Trp-haltigen Liganden zu verringern, wurde bei den Messungen Acrylamid als Quencher verwendet, was den Hintergrund minimierte. Wegen der Absorption des Trp des Liganden, aber auch wegen 1-Nal, 2-Nal und Bpa wurde die Emissionswellenlänge auf 300 nm gesetzt, um den Filtereffekt zu verringern. Dennoch muss der Filtereffekt bei der Titration mit berücksichtigt werden. Die Trp-haltigen Liganden zeigten in der FT im Allgemeinen bemerkenswert hohe Werte für den Proportionalitätsfaktor  $\delta$  (siehe Gleichung 9.10), was darauf hinweist, dass das Trp des Liganden in seiner Bindetasche an VASP-EVH1 womöglich vom Quencher abgeschirmt wird.

Das Trp als Ersetzung des bindungsentscheidenden Phenylalanins erhöhte zwar die Affinität, gleichzeitig verringerte es die Geschwindigkeit mit der das Gleichgewicht der Reaktion erreicht wurde. Für die FT war die Zeit zwischen zwei Injektionen eine Minute lang, für die ITC dagegen etwas mehr als 21 Minuten. Daher ist für die FT die Reaktion sicher nicht im Gleichgewicht und die ermittelten  $K_D$ -Werte sind zu groß geschätzt. Ausserdem ist Bpa photoreaktiv [68], daher ist die ermittelte  $K_D$  für die FT zu optimistisch. Wir verzichteten daher für alle Liganden auf die Ermittlung von  $\Delta\Delta G$ .

**Bindungsdaten ITC** Die Titrations für L-Cha, 1-Nal und 2-Nal wurden mit der ITC200 aufgenommen. Die Auswertung der Titrations für L-Cha und 2-Nal mit dem Regressionstyp 000 führte zu sehr grossen Standardfehler für die  $K_D$ , weswegen mit dem Regressionstyp 011 gefittet wurde. Die Routine `confint` versagte dabei für die obere Grenze des Konfidenzintervalls. Daher wurden Bootstrap-Konfidenzintervalle angegeben.

Da wir aufgrund der Automatisierung in der ITC, im Gegensatz zur FT, zwischen

zwei Injektionen fast beliebig viel Zeit lassen können, konnten wir die Reaktion bis ins Gleichgewicht verfolgen. Daher sind die ermittelten Affinitäten hier höher, als mit die mit der FT bestimmten Werte.

Bis auf die Ersetzung mit D-Cha führten alle Ersetzungen zu keiner statistisch signifikanten Änderung der Affinität gegenüber dem Threonin, auch wenn man eine geringe Erhöhung für 2Cl-Phe ausmachen könnte. Diese Erhöhung ist zum einen nur gering (ca. 1 kJ/mol), zum anderen überlappen sich die Konfidenzintervalle für 2Cl-Phe und Thr, wenn auch gering. Wir verzichteten daher hier auf die Ermittlung von  $\Delta\Delta G$  und die Untersuchung des Einflusses der Protein- und Ligandkonzentration auf die statistische Signifikanz von  $\Delta\Delta G$ .

### 15.3. Kombination N- und C-terminalen Ersetzungen

Mit unserem Wissen über die Variationen der flankierenden Epitope, der Ersetzungen für das bindungsentscheidende Phenylalanin und die besten Ersetzungen der Proline mit dem X-Baustein, konnten wir nun unsere kleinsten Liganden aufbauen (siehe Tab. 20.26 und 20.27).

**Ac-(2Cl-Phe)-PPPP-(2Cl-Phe)-NH<sub>2</sub>** Es zeigte sich, dass allein die Flankierung des Polyprolinsequenz mit zwei 2Cl-Phe zu einer dramatischen Verbesserung der Affinität gegenüber dem Ac-FPPPPT-NH<sub>2</sub> führte, da letzteres mit einer sehr hohe  $K_D$  im dreistelligen  $\mu\text{M}$ -Bereich an VASP-EVH1 und Mena-EVH1 bindet [93, 9]. Der zweimal 2Cl-Phe-Ligand bindet faktisch genauso gut, wie das ActA-Peptid, was an sich schon bemerkenswert ist. Der  $Q$ -Wert für die FT war für diesen Liganden null, jedoch war der  $P$ -Wert in Ordnung. Es wird angenommen, dass die Anzahl der Replikate mit 3 zu gering war und die Standardabweichung jedes Messpunktes unterschätzt wurde.

**(2Cl-Phe)-PPPP-(2Cl-Phe)-NH<sub>2</sub>** Lag der freie N-Terminus des zweimal 2Cl-Phe-Liganden vor, dann verschlechterte sich die Affinität rapide, wie auch für andere verkürzte Liganden mit freiem N-Terminus (vergleiche Tab. 20.15), ist aber immer noch besser als von Ac-FPPPPT-NH<sub>2</sub>. Die Affinität des Liganden war bei bei 25°C zwar mittels FT, aber nicht mit der ITC bestimmbar. Das gelang für die ITC erst bei 8°C, und dann war die Enthalpieänderung positiv. Der Ligand band also bei 25°C rein entropisch an VASP-EVH1. Wir können mit der Annahme von  $\Delta H = 0$  bei 25°C die Wärmereaktionskapazität grob mit  $\Delta C_p \approx +300 \text{ J}/(\text{mol K})$  bestimmen, der den hydrophobe Charakter der Bindung des Liganden an VASP-EVH1 anzeigt [47].

**Ac-(2Cl-Phe)-PPX-(2Cl-Phe)-NH<sub>2</sub>** Ersetzten wir zusätzlich die letzten beiden Proline mit dem X-Baustein, so verbesserte sich die Affinität des Ac-(2Cl-Phe)-PPX-(2Cl-Phe)-NH<sub>2</sub> in der ITC gegenüber dem ActA-Peptid, für die FT band der Ligand genauso gut an VASP-EVH1 wie das ActA-Peptid.

Der  $R_{\text{linear}}^2$ -Wert der ITC-Daten ist mit 0,532 für diesen Liganden der drittkleinste Wert dieser Arbeit. Der Grund liegt hier wahrscheinlich in der Verwendung der ITC200, die zwar die Verwendung von sehr kleinen Volumen an Protein und Ligand ermöglichte, dies jedoch auf Kosten der Messempfindlichkeit und der Anzahl an Datenpunkten je Titration, was den statistischen Freiheitsgrad einschränkte. Es zeigte sich auch, dass die Reproduzierbarkeit der Messungen (an ein und der selben Maschine) nicht die Präzision der VP-ITC erreichte. Durch die Aufnahme von drei Wiederholungen versuchten wir (generell) eine bessere Schätzung der residualen Varianz und eine Erhöhung der statistischen Freiheitsgrade zu erreichen und damit eine bessere (und realistischere) Schätzung der Messunsicherheit der  $K_D$  und  $\Delta G^\circ$  zu erreichen.

Die Daten liessen sich nicht einer Monte-Carlo-Simulation unterwerfen, da während der Simulation zu viele Fehler auftraten. Daher müssen wir hier auf eine Betrachtung des Einflusses der Fehler der Protein- und Ligandkonzentration auf  $\Delta G^\circ$  verzichten.

Mit der Verkürzung setzten auch Löslichkeitsprobleme ein, da der Ligand keine geladenen Reste mehr hat. So war der Ligand schlechter als 2,6 mM löslich. Ausserdem blieb ein sehr klebriges Pellet übrig, dass sich nicht auflösen liess. Daher wich die reale Konzentration von der nominellen sehr stark ab, so dass die FT – bei der wir leider nicht das Modell 8.5 anwenden konnten – tendenziell die  $K_D$  zu hoch schätzte. Mit der ITC wurde die reale Konzentration auf etwa 60 % der nominellen geschätzt, so dass sich die  $K_D$  der FT mit diesem Wert der realen Ligandkonzentration zu  $K_D = 10 (1) \mu\text{M}$  ergibt, und damit den gleichen Wert wie die ITC- $K_D$  annimmt. Es ist daher wohl so, dass der Ligand auch in der FT besser an VASP-EVH1 als das ActA-Peptid binden.

**Ac-(2Cl-Phe)-PPX-NH<sub>2</sub>** Da der Ligand Ac-(2Cl-Phe)-PPX-(2Cl-Phe)-NH<sub>2</sub> besser als das ActA-Peptid band, versuchten wir einen Liganden ohne das zweite 2Cl-Phe. Dies bedeutete eine Reduktion des Liganden auf das Kernmotiv FPPPP.

Die Verkürzung um das C-terminale 2Cl-Phe bewirkte einen Verlust von ca. 2kJ/mol an Affinität (siehe Tab. 20.27). Der Ligand band in der ITC aber immer noch genauso gut wie das ActA-Peptid an VASP-EVH1, in der FT jedoch mit einer doppelt so großen  $K_D$ , und damit immer noch wesentlich besser als das Peptid Ac-FPPPPPT-NH<sub>2</sub>, mit der von Ball et al. ermittelten Affinität für diesen Liganden [9].

Die Stammlösung des Ac-(2Cl-Phe)-PPX-NH<sub>2</sub> war mit einem fluoreszenten Farbstoff

„verunreinigt“, vermutlich Fmoc-Reste aus der Synthese, wodurch sich der Hintergrund der FT stark erhöhte. Daher wurden hier die Anregungs- und Emissionswellenlängen auf 296 und 350 nm und die Spaltenbreiten für beide Wellenlängen auf 1 nm gesetzt. Das erhöhte das Rauschen, die residuale Varianz und damit die Messunsicherheit für die  $K_D$  bzw.  $\Delta G^\circ$ . Daher war auch der  $R_{\text{linear}}^2$ -Wert mit 0,163 der kleinste Wert, der in dieser Arbeit bestimmt wurde. Wir versuchten dieser ungünstigen Ausgangslage des Regressionsproblems durch eine massive Erhöhung der statistischen Freiheitsgrade auf 98 für die Hintergrundmessung und die eigentliche Titration entgegen zu wirken.

Genau wie für Ac-(2Cl-Phe)-PPX-(2Cl-Phe)-NH<sub>2</sub> hatten wir Löslichkeitsprobleme, da auch dieser Ligand kleiner als 2,6 mM löslich war. Es bildete sich nach Zentrifugation ein Pellet, das jedoch über Vortexen auflösbar war, aber nach Zentrifugation wieder erschien. Wir verwendeten den löslichen Überstand für die Titration. Da auch hier die reale Konzentration von der nominellen Konzentration stark abwich, ist die  $K_D$  der FT gegenüber der ITC tendenziell zu hoch geschätzt. Wir konnten zwar das Modell 8.5 für den Datenfit verwenden und erhielten einen  $K_D$ -Wert vergleichbar der aus der ITC, jedoch war die Signifikanz der  $K_D$  für die FT unter diesen Bedingungen nicht gegeben. Benutzen wir jedoch den  $M$ -Wert der ITC, so erhielten wir für die FT eine  $K_D = 20(6) \mu\text{M}$ , so dass der Ligand auch für die FT mit der gleichen Affinität wie das ActA-Peptid an VASP-EVH1 band.



Teil V.  
Diskussion



## 16. Einleitung zur Diskussion

Wir konnten erstmals alle Proline des ActA-Peptids durch die unnatürlichen Diprolinbausteine X und Spir2 (siehe Abb. 1.1) ersetzen und gewannen damit an Affinität (siehe Tab. 20.2 und 20.6). Das ist nach unserem Wissen das erste Mal, dass eine vollständige Ersetzung aller Proline des ActA-Peptids zu einer Verbesserung der Affinität führte. Es ist auch ein Beleg für die Vorzüge und Stärken des rationellen Ligandendesigns gegenüber einem Design des Versuch-und-Irrtums: Wenn strukturelle und biophysikalische Daten in ausreichender Güte für den interessierenden Protein-Ligand-Komplex vorliegen, kann das rationale Design auch bei scheinbar aussichtslosen Fällen überraschende Lösungen finden.

Aber auch die Ersetzungen der letzten beiden Proline des ActA-Peptids mit dem X-Baustein allein führte zu einer Erhöhung der Affinität gegenüber dem ActA-Peptid (siehe Tab. 20.2 und 20.3). Mittels  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren konnten wir auch zeigen, dass wenigstens die Peptidchimären mit dem X-Baustein das gleiche Bindungsmotiv wie das ActA-Peptid an VASP-EVH1 aufwiesen (siehe Abb. 13.4 und 13.5). Zusätzlich war es uns möglich, die Stöchiometrie der Bindung des ActA-Peptids und der PPX-Chimäre als 1:1 zu bestimmen, so dass unsere Interpretation der Bindungsdaten unterstützt wurde (siehe Tab. 20.5).

Wir waren in der Lage, das bindungsrelevante Phenylalanin des ActA-Peptids zu ersetzen und gewannen mit 2-Chlor-Phenylalanin wesentlich an Affinität dazu (siehe Tab. 20.8 und 20.9). Kombinierten wir unsere besten Ersetzungen für die Proline und das bindungsentscheidende Phenylalanin, so erhielten wir nanomolar bindende Liganden (siehe Tab. 20.11 und 20.6). Auch dies ist ein Novum und belegt, dass die als „undruggable“ bezeichneten Protein-Protein-Interaktionen eben dieses Stigma mit neuen Methoden und Ansätzen (weiter) verlieren dürften.

Unsere bindungsstärksten Liganden waren promisk und banden, außer an VASP-EVH1, mit fast gleicher Affinität an Enah-EVH1 und EVL-EVH1 (siehe Tab. 20.14). Jedoch ist dies ein bekanntes Verhalten des ActA-Peptids, wobei es nach Holtzman et al. zumindest theoretisch möglich erscheint, spezifischere Liganden für die drei EVH1-Domänen zu erzeugen [54].

Wir konnten mit unseren Ersetzungen auch das ActA-Peptid auf ein Äquivalent von

vier Aminosäuren verkürzen (Ac-(2Cl-Phe)-PPX-NH<sub>2</sub>), verringerten so das Molekulargewicht von 1630 Da auf 750 Da und erhielten immer noch eine Affinität wie für das unverkürzte und unveränderte ActA-Peptid (siehe Tab. 20.26). Ohne unsere Ersetzungen wäre die Affinität des verkürzten ActA-Peptids Ac-FPPPP-NH<sub>2</sub> sehr gering bis gar nicht mehr vorhanden [9, 93].

Die Analyse unserer Daten zeigte eine ganze Reihe an Möglichkeiten für diese verkürzten Peptide auf, um deren Affinität und/oder Löslichkeit zu verbessern. Das bedeutet auch, dass noch viel Raum für weitere Entwicklung gegeben ist und wir bisher in keiner Sackgasse gelandet sind, wobei wir immer noch in den Vorzug des Genusses des rationellen Ligandendesigns kommen: wir müssen nicht raten. Oder besser: wir können *gezielt* raten, da unsere Verbesserungsvorschläge auf unserem (nun mehr verbesserten) empirischen Wissenstand aufbauen können.

# 17. Ersetzung der Proline des ActA-Peptids mit dem X- und dem Spir2-Baustein

## 17.1. Der X-Baustein

Wir tauschten jeweils zwei Proline des ActA-Peptids Ac-SFEF PPPP TEDEL-NH<sub>2</sub> mit unserem X-Baustein aus, bis letztlich alle Proline ausgetauscht waren. Dabei zeigte sich, dass die Vinylbrücke des X-Bausteins einen positionabhängigen Einfluss auf die Affinität der Peptidchimären hatte. Jedoch banden alle Chimären an das gleiche Epitop des VASP-EVH1 wie das ActA-Peptid (siehe Abb. 13.4 und 13.5). Interessante Unterschiede fanden wir jedoch für die Interaktion mit dem  $\epsilon$ -NH des Trp23 des VASP-EVH1 (siehe Abb. 13.6).

**XPP: Verringerung der Affinität** Der Austausch der ersten beiden Proline mit X führte zu einer Verringerung in der Affinität gegenüber dem Referenzpeptid (siehe Tab. 20.2 und 20.3). Diese Verringerung, ausgedrückt als die Differenz  $\Delta\Delta G$ , war für die Annahme der unbekanntem Fehler der Protein- und Ligandkonzentration von  $\sigma = 10\%$  noch für beide Messmethoden (CVM und ITC) statistisch signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha = 5\%$ ). Wurde der angenommene Fehler für die Protein- oder die Ligandkonzentration allerdings  $20\%$ , wurde das Bild uneinheitlich, und für einen gemeinsamen Fehler von  $20\%$  ist die Verringerung der Affinität sogar nicht signifikant (siehe Tab. 20.4). Statt der (optimistischen) Annahme, dass die Affinität der XPP-Chimäre sich nicht signifikant von der des Referenzpeptids unterscheidet, wählen wir die gegenteilige (pessimistische) Annahme. So oder so ist der X-Baustein zwar eine mögliche, aber keine optimale Ersetzung der ersten beiden Proline des ActA-Peptids.

Die Interaktion des mittleren Carbonylsauerstoffs mit dem  $\epsilon$ -NH des Trp23 des VASP-EVH1 unterscheidet sich von der des Referenzpeptids, was ein zusätzliches Indiz für den Einfluss der Vinylbrücke und unsere pessimistische Einschätzung der Verringerung der Affinität ist (siehe Abb. 13.6).

Wir interpretieren unsere Daten nun folgendermaßen: (i) Die Vinylbrücke des X-Bausteins wechselwirkt mit der Proteinoberfläche und hebelt den Carbonylsauerstoff des dritten Prolins ein wenig aus seiner ursprünglichen Position. Das stört dann vermutlich die wichtige Wasserstoffbrücke zum  $\varepsilon$ -NH des Trp23 (siehe auch Abb. 17.1). (ii) Nach der Kristallstruktur des verwandten Mena-EVH1 im Komplex mit Ac-FPPPPPT-NH<sub>2</sub> [93] interagiert ein Wassermolekül mit dem Carbonylsauerstoff des dritten Prolins und konkurriert so mit dem  $\varepsilon$ -NH des Trp23. Diese Konkurrenz könnte sich für die XPP-Chimäre verstärken, da der Carbonylsauerstoff nicht mehr optimal zum  $\varepsilon$ -NH steht und so die Wasserstoffbrücke des Carbonylsauerstoffs mit dem  $\varepsilon$ -NH weiter schwächen (siehe auch Abb. 17.1).

**PXP: Kein Einfluss der Vinylbrücke** Die Ersetzung der mittleren beiden Proline mit X führte zu keiner signifikanten Änderung der Affinität, der Enthalpie und der entropischen Energie gegenüber dem Referenzpeptid (siehe Tab. 20.2 und 20.3). Auch die Interaktion des mittleren Carbonylsauerstoffs mit dem  $\varepsilon$ -NH des Trp23 scheint sich kaum vom Referenzpeptid zu unterscheiden (siehe Abb. 13.6). Daraus ist zu schlussfolgern, dass die Vinylbrücke keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung dieser Chimäre hat. Das scheint verständlich, da die Vinylbrücke in das Medium zeigt und keinen Kontakt zur Proteinoberfläche hat (siehe Abb. 17.2).

Der X-Baustein besitzt eine fixierte PPII-Konformation, diese bringt hier aber keine Verbesserung in der Affinität, woraus wir schlussfolgern können, dass die Polyprolinsequenz des ActA-Peptids wahrscheinlich selbst schon als PPII vorliegt. Eine weitere Präferenzierung der PPII durch den X-Baustein bringt dann hier natürlich keinen weiteren Vorteil.

**PPX: Erhöhung der Affinität** Der Austausch der letzten beiden Proline erbrachte nun eine statistisch signifikante Erhöhung der Affinität (siehe Tab. 20.2, 20.3). Dabei war die Erhöhung sogar dann noch signifikant (für  $\alpha = 5\%$ ), wenn der angenommene Fehler für die Protein- und Ligandkonzentration 20% war (siehe Tab. 20.4). Wir können daher davon ausgehen, dass die beobachtete Erhöhung echt sei.

Die Interaktion des mittleren Carbonylsauerstoffs mit dem  $\varepsilon$ -NH des Trp23 entsprach dem des Referenzpeptids (siehe Abb. 13.6). Darüber hinaus scheinen wir eine Änderung in der Enthalpie und der entropischen Energie gegenüber dem ActA-Peptid zu haben, ganz in Gegensatz zu allen anderen getesteten Chimären (siehe Tab. 20.2).

Wir interpretieren die Erhöhung der Affinität mit der Interaktion der Vinylbrücke mit dem Ring des Phe79 des VASP-Evh1 (siehe auch Abb. 17.3). Dabei sei daran erinnert,

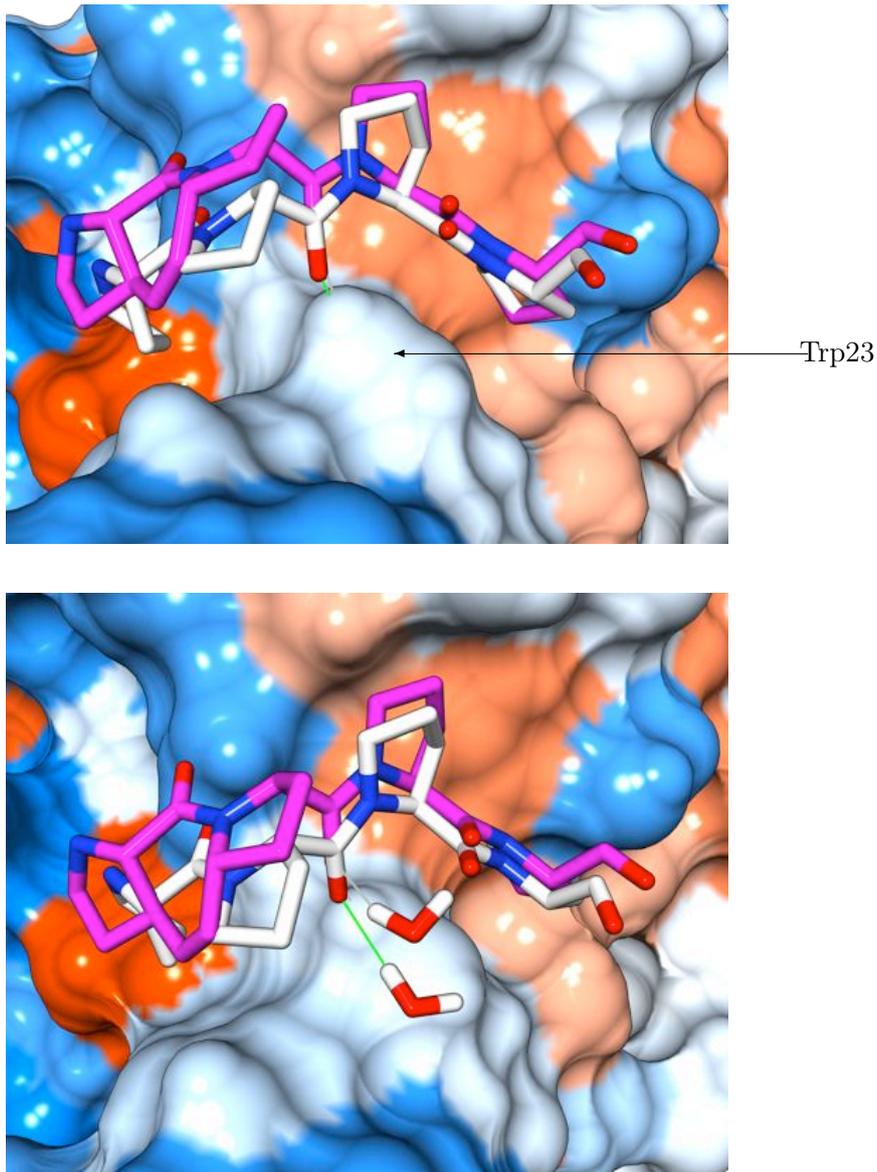


Abbildung 17.1.: Modell der Bindung des XPP-Liganden. Die PPII-Helix ist in weiß und die XPP-Sequenz ist in magenta gehalten. Die Proteinoberfläche ist nach Hydrophobizität eingefärbt, wo dunkelblau stark hydrophil und orange stark hydrophob darstellt. Die Vinylbrücke des X-Bausteins hebt die XPP-Sequenz aus der optimalen Position, wie sie für die PPPP-Sequenz dargestellt ist. Das stört zum einen die Wasserstoffbrücke zum Trp23 (grün für PPPP, grau für XPP), zum anderen kann ein Wassermolekül besser mit dem Carbonylsauerstoff eine Wasserstoffbrücke ausbilden und so die Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff und dem  $\epsilon$ -NH des Trp23 zusätzlich schwächen.

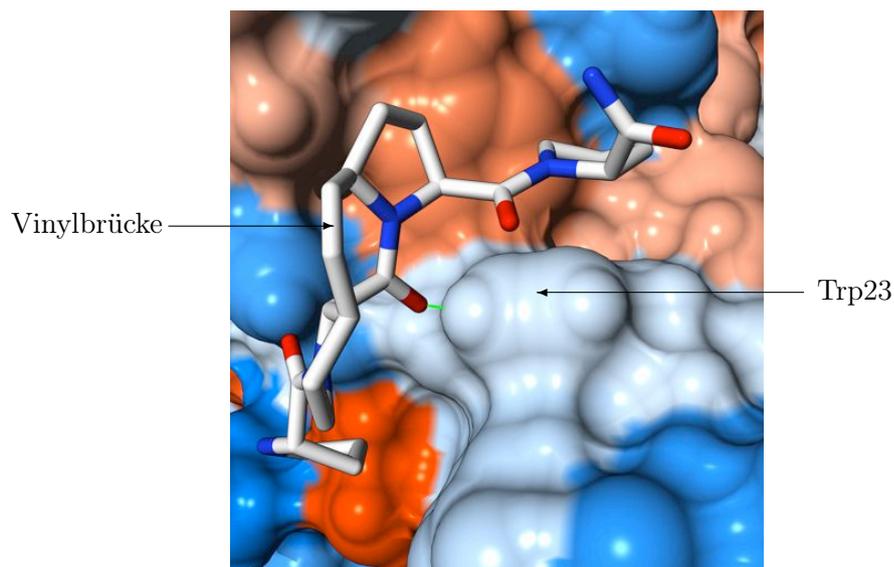


Abbildung 17.2.: Die Vinylbrücke des X-Bausteins für die PXP-Chimäre zeigt in das Lösungsmittel und hat keinen Kontakt zur Proteinoberfläche. In grün ist die Wasserstoffbrücke zwischen dem  $\epsilon$ -NH und dem Carbonylsauerstoff des dritten Prolins dargestellt.

dass die PPPP-Sequenz nur durch zwei Wasserstoffbrücken mit dem VASP-EVH1 interagiert, wobei sich diese zwischen dem ersten und dem zweiten (Carbonylsauerstoff mit dem  $\epsilon$ -NH des Gln81) und dem zweiten und dritten Prolin (Carbonylsauerstoff mit  $\epsilon$ -NH des Trp23) befinden. Das dritte und vierte Prolin interagieren nur über hydrophobe Effekte mit der Proteinoberfläche, und diese Interaktion wird nun durch die Vinylbrücke verstärkt. Daher ist anzunehmen, dass die PPX-Sequenz um das wichtige Trp23 herum fester verankert ist, als die PPPP-Sequenz.

Die Änderung der Enthalpie und entropischen Energie gegenüber der Bindung des ActA-Peptids interpretieren wir als eine Änderung der Interaktion eines Wassermoleküls mit der PPX-Chimäre gegenüber der Referenz. So ist in der Kristallstruktur des Enah-EVH1 mit Ac-FPPPPT-NH<sub>2</sub> ein Wassermolekül zu finden, das zusammen mit dem  $\epsilon$ -NH des Trp23 um das mittlere Carbonylsauerstoff konkurriert [93]. Für die PPX-Chimäre scheint es nun möglich zu sein, dass die Vinylbrücke den X-Bausteins ein wenig kippt, so dass sich der Winkel des Carbonylsauerstoffs des X-Bausteins gegenüber dem Referenzpeptid so ändert, dass der Carbonylsauerstoff des X-Bausteins für das Wassermolekül ein attraktiveres Ziel wird (siehe Abb. 17.3). Das könnte die Wasserstoffbrücke des mittleren Carbonylsauerstoffs mit dem  $\epsilon$ -NH des Trp23 stärken und zusätzlich die Enthalpie erhöhen.

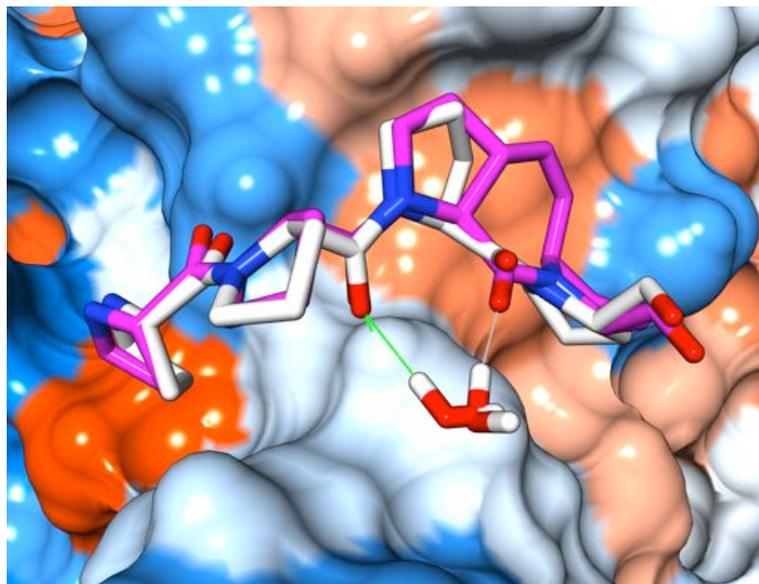


Abbildung 17.3.: Modell der Bindung des PPX-Liganden. Die PPII-Helix ist in weiß und die PPX-Sequenz ist in magenta gehalten. Die Wasserstoffbrücke zwischen dem Wassermolekül und der PPPP-Sequenz ist grün und für die PPX-Sequenz grau dargestellt.

**XX: Überlagerung von PPX und XPP** Der Austausch *aller* Proline mit X erhöht unter optimistischen Gesichtspunkten die Affinität zu VASP-EVH1, unter pessimistischen Gesichtspunkten ändert sich die Affinität der Chimäre nicht. So erhalten wir für die ITC eine statistisch signifikante Erhöhung der Affinität (siehe Tab. 20.2, 20.3), die sogar signifikant bleibt, wenn wir einen Fehler von 20% für die Protein- und die Ligandkonzentration annehmen (Tab. 20.4). Für die CVM ist die Messunsicherheit dagegen zu groß, so dass sich die Affinität nicht von der des Referenzpeptids unterscheidet. Da aber das Konfidenzintervall der Differenz  $\Delta\Delta G$  für die CVM das Konfidenzintervall der  $\Delta\Delta G$  der ITC umschließt, widersprechen die Daten der CVM dem ITC-Befund aber auch nicht. Wir können also vorsichtig optimistisch von einer (leichten) Erhöhung der Affinität ausgehen.

Die XX-Chimäre zeigte, ähnlich wie die XPP-Chimäre, für die Interaktion des mittleren Carbonylsauerstoffs mit dem  $\epsilon$ -NH des Trp23 praktisch keinen Shift, ganz im Unterschied zum ActA-Peptid, dem PPX- und PXP-Liganden.

Wir interpretieren unsere Daten nun so, dass sich die Bindung des XX-Ligand wie eine Überlagerung von XPP- und PPX-Ligand verhält. So kompensiert die Interaktion der Vinylbrücke des zweiten X (Ersetzung des dritten und vierten Prolins) die Affinitätseinbußen durch das erste X (Ersetzung des ersten und zweiten Prolins). Dabei hebt das

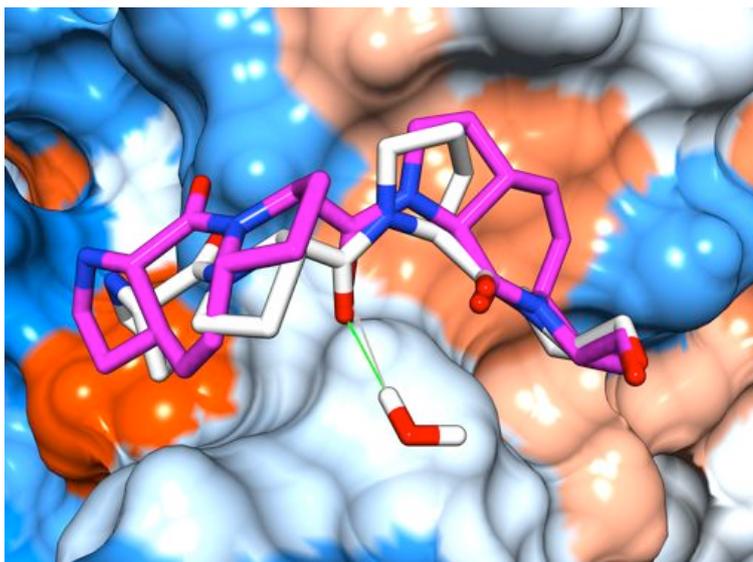


Abbildung 17.4.: Modell der Bindung des XX-Liganden. Der Ligand verhält sich wie eine Kombination der Eigenschaften der XPP- und der PPX-Chimäre. Bei der Ersetzung der ersten beiden Proline führt die Vinylbrücke des X-Bausteins zu einer Störung der Bindung, wohingegen die Vinylbrücke des X-Bausteins für die Ersetzung der letzten beiden Proline die Bindung verstärkt.

erste X womöglich etwas aus der Bindungsstelle, wobei sich die Interaktion des Wassermoleküls mit dem mittleren Carbonylsauerstoff verstärken könnte und so die Konkurrenz mit dem  $\epsilon$ -NH des Trp23 verschärft (siehe Abb. 17.4).

## 17.2. Der Spir2-Baustein

Für den (Spir2)X-Ligand fanden wir für unsere ITC-Daten eine höhere Affinität zu VASP-EVH1 als für den PPX-Liganden. Dagegen ergibt sich für die Fluo-Daten für die beiden Liganden kein Unterschied (siehe Tab. 20.6 und 20.7). Darüber hinaus fanden wir für den (Spir2)X-Liganden auch keinen Unterschied zwischen ITC- und Fluo-Daten, wie für den PPX-Liganden. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, mehr als einen Datensatz für den Spir2 enthaltenen Liganden für die ITC aufzunehmen. Sollte sich dennoch in zukünftigen Wiederholungen dieser Messung der Unterschied für die beiden Liganden in der ITC manifestieren, so wären Erklärungen des Unterschiedes für die ITC-Daten: (i) Während für den XPP-Liganden die Vinylbrücke störend wirkt, ist die Vinylbrücke des Spir2-Bausteins anscheinend nicht hinderlich für die Bindung. Wir

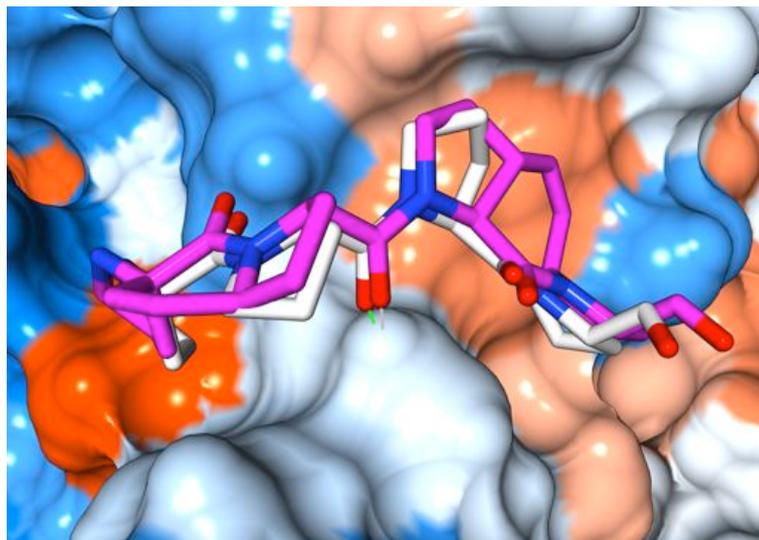


Abbildung 17.5.: Modell der Bindung des (Spir2)X-Liganden. Die Vinylbrücke des Spir2-Baustein stört die Bindung nicht. Die Vinylbrücke des X-Bausteins für die Ersetzung der letzten beiden Proline führt zu einer Verstärkung der Bindung. Insgesamt kommt der (Spir2)X-Ligand der PPII-Helix des natürlichen Liganden sehr nahe.

interpretieren dies so, dass die Vinylbrücke des Spir2-Bausteins den Liganden nicht mehr, wie für den X-Baustein, aus der Bindungstelle hebt (siehe Abb. 17.5). Die Bindung des (Spir2)X-Motivs scheint vielmehr dem des PPPP-Motivs zu entsprechen. (ii) Die Vinylbrücke des Spir2 präkonformiert den Liganden in einer oder mehreren bindungsrelevanten Konformationen (siehe auch den Abschnitt Cis-Trans-Isomerie auf Seite 153),

Wir müssen allerdings darauf hinweisen, dass die Untersuchungen für den Spir2-Baustein noch am Anfang stehen. So fehlt bspw. der (Spir2)PP Ligand. Auch fehlen die Fluoreszenzdaten für das vom ActA-Peptid abgeleitete Ac-SFE-(2Cl-Phe)-XX-TEDEL-NH<sub>2</sub>, um es mit dem entsprechenden (Spir2)X-Liganden vergleichen zu können.

### 17.3. Andere Ersetzungs- und Verbesserungsmöglichkeiten für die Diprolinbausteine

Das vierte Prolin könnte mit 1,3-Oxazolidin-4-Carboxylsäure oder (2*S*,4*S*)-Hydroxyprolin ersetzt werden, in der Hoffnung, dass der Ether-Sauerstoff, oder die Hydroxygruppe mit dem Asparagin 92 (VASP-EVH1), 89 (Enah-EVH1) bzw. 86 (EVL-EVH1) eine Wasserstoffbrücke ausbildet und so die Affinität, aber auch die Löslichkeit erhöht (siehe

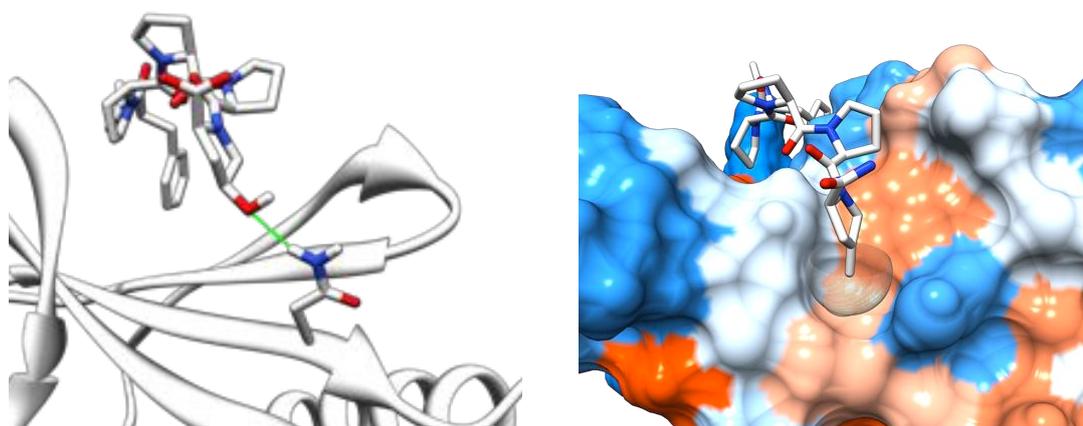


Abbildung 17.6.: Mögliche Änderungen des vierten Prolins: (2*S*,4*S*)-4-Hydroxyprolin (links) könnte eine Wasserstoffbrücke (grün) zum Asp92 ausbilden, 4-Methylen-L-Prolin (rechts) könnte die hydrophobe Wechselwirkung erhöhen.

Abb. 17.6). Vorzugsweise wäre dies als Derivat des X-Bausteins denkbar. 4-Oxopyrrolidin-2-Carboxylsäure könnte ebenfalls eine Alternative sein. Eine andere Ersetzung für das vierte Prolin könnte das 4-Methylen-L-Prolin sein, in der Hoffnung, der Methylen-Rest fülle die Tasche des vierten Prolins besser aus (siehe Abb. 17.6). Dies könnte die Affinität durch Erhöhung der hydrophoben Wechselwirkung verbessern. Sollte sich diese Änderung als vorteilhaft erweisen, wäre es auch hier von Vorteil, den X-Baustein entsprechend abwandeln zu können. Aber auch Homoprolin als Ersetzung des ersten und des vierten Prolins könnte die Affinität aufgrund der Erhöhung der hydrophobewechselwirkung erhöhen.

Da nach dem Substitutionsspotarray für das ActA-Peptid das dritte Prolin auch gegen Leucin ausgetauscht werden kann [9], könnte auch ein Leu-Pro Mimetika interessant sein. Aber auch Substitutionen der Wasserstoffe der Vinylbrücke, z. B. mit Methylresten, könnte die Affinität erhöhen.

# 18. Ersetzung des bindungsentscheidenden Phenylalanins des ActA-Peptids und unsere besten Binder

Es ist aus [9] bekannt, dass das Phenylalanin, welches dem ersten Prolin vorgeht, praktisch nur durch Tryptophan ersetzt werden kann, es daher mit den Prolinen bindungsentscheidend ist. Um diese Aminosäure zu ersetzen, führten wir einen Spotarray durch, in welchem das Phenylalanin durch verschiedene unnatürliche, aber auch natürliche Aminosäuren ausgetauscht wurde (siehe Abb. 14.1). Die Bindungssequenz P1 stellt die ActA-Sequenz und P2 eine verkürzte ActA-Sequenz dar. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Verkürzung um die ersten drei Aminosäuren SFE die Affinität verringert [9] (siehe auch Tab. 20.15). Aus unseren eigenen Arbeiten wissen wir zusätzlich, dass sich die Affinität noch einmal verringert, wenn diese verkürzte Sequenz zusätzlich einen freien N-Terminus aufweist (siehe auch Tab. 20.15). Die Sequenz P2 stellt also eine verschärfte Bedingung für die Auswahl der Ersetzungen des Phenylalanins dar.

## 18.1. Unnatürliche Aminosäuren erhöhen die Affinität

Für die Bindungssequenz P1 konnten wir eine ganze Reihe an unnatürlichen Aminosäuren als Ersetzung für das Phenylalanin finden: 2-Chlor-Phenylalanin, Homophenylalanin, Thienylalanin, 1- und 2-Naphtylalanin, 4-Benzoyl-Phenylalanin und L-Cyclohexylalanin. Unter den verschärften Bedingungen der Bindungssequenz P2 blieben von diesen nur zwei Aminosäuren übrig: 2-Chlor-Phenylalanin und 1-Naphtylalanin (siehe Abb. 14.1). In unseren Bindungsstudien fanden wir, dass das 2-Chlor-Phenylalanin mit  $\Delta\Delta G = -6,3 (0,3) \text{ kJ/mol}$  die größte Affinitätserhöhung gegenüber dem Referenzpeptid erzeugt, gefolgt von Tryptophan und 1-Naphtylalanin (siehe auch Tab. 20.8, 20.9 und 18.1). Dabei war bereits aus der Literatur bekannt, dass Tryptophan gegenüber Phenylalanin die Affinität des Liganden erhöht [121].

**Hydrophobe und Kation- $\pi$ -Wechselwirkung bestimmen die Bindung der aromatischen Seitenkette** Zur Bindung des Phenylalaninrestes könnte neben der hydrophoben Wechselwirkung auch eine Kation- $\pi$  Wechselwirkung [43, 28] zwischen dem aromatischen Ring und dem Arg83 (VASP-EVH1), bzw. Arg81 (Enah-EVH1) und Arg82 (EVL-EVH1) der Bindungstasche beitragen (siehe auch Abb. 18.1). So fanden wir für Enah-EVH1 in der Kristallstruktur **1evh** [93] mittels des Programms **Capture**<sup>1</sup> [43] eine Kation- $\pi$  Wechselwirkung für das Phenylalanin des Liganden und dem Arg81 von Enah-EVH1 (siehe auch Tab. 14.1). In der Kristallstruktur **1qc6** [36] für EVL-EVH1 fanden wir dagegen keine Kation- $\pi$  Wechselwirkung. Der Grund ist der, dass die Kontakte der Protein-Ligand-Komplexe im Kristall für beide Strukturen um die Phenylalaninbindungsstelle wesentlich die Strukturen beeinflussen. Das in Frage kommende Arginin befindet sich an der Oberfläche des Proteins und ist damit flexibel. So befindet sich das Arg83 der NMR-Struktur **1egx** von VASP-EVH1 [9] in einer vergleichbaren Position wie das Arg81 für den Enah-EVH1 Komplexe **1evh** [93]. Wir nehmen daher die gefundene Kation- $\pi$ -Wechselwirkung für Enah-EVH1 als ein Indiz an, dass im nativen Protein-Ligand-Komplex eine solche Kation- $\pi$ -Wechselwirkung möglich wäre.

Die vermutete Kation- $\pi$  Wechselwirkung sollte speziell für Tryptophan einen größeren Anteil zur Erhöhung der Bindungsstärke beitragen, als für Phenylalanin. So berichtet Gallivan et al. das Tryptophan/Arginin die stärkste Kation- $\pi$  Wechselwirkung unter den proteinogenen Aminosäuren ausbilden können [43, 28]. Aber auch für den 1-Naphtylalanin-Rest sollte die Kation- $\pi$ -Wechselwirkung stärker als für Phenylalanin, aber geringer als für Tryptophan sein [80]. Der 2-Chlor-Phenylalaninrest hingegen sollte eine geringere Kation- $\pi$ -Wechselwirkung als der Phenylalaninrest zeigen [107, 80]. Dennoch binden der 2-Chlor-Phenylalanin- und 1-Naphtylalanin-Ligand, nicht jedoch der Tryptophan-Ligand, unter den verschärften Bedingungen der P2-Sequenz. Dies zeigt, dass die Kation- $\pi$ -Wechselwirkung nur einen zusätzlichen Beitrag liefern würde, wohingegen der Hauptbeitrag durch die hydrophoben Wechselwirkungen bewirkt wird. So bindet der L-Cyclohexylalanin-Ligand im Spotarray und in den Bindungsstudien, obwohl gerade der Cyclohexylring keine Kation- $\pi$  Wechselwirkung ausbildet [43, 80]. Nehmen wir nun an, dass die nicht-planaren Konformationen des Cyclohexylrestes keinen Einfluss auf die Bindung habe, so können wir aus dem Vergleich der Affinitäten des L-Cyclohexylalanin-Liganden zum Referenzpeptid schließen, dass die Kation- $\pi$  Wechselwirkung ca. 2,5 kJ/mol zur Bindung beitragen würde. In diesem Zusammenhang sei anzumerken, dass im Spotarray der 2- und der 3-Pyridylalanin-Ligand nicht oder nur sehr schwach gebunden hatte (siehe P1 in Abb 14.1). Wir vermuten, dass die Mesomerie

---

<sup>1</sup><http://capture.caltech.edu/>

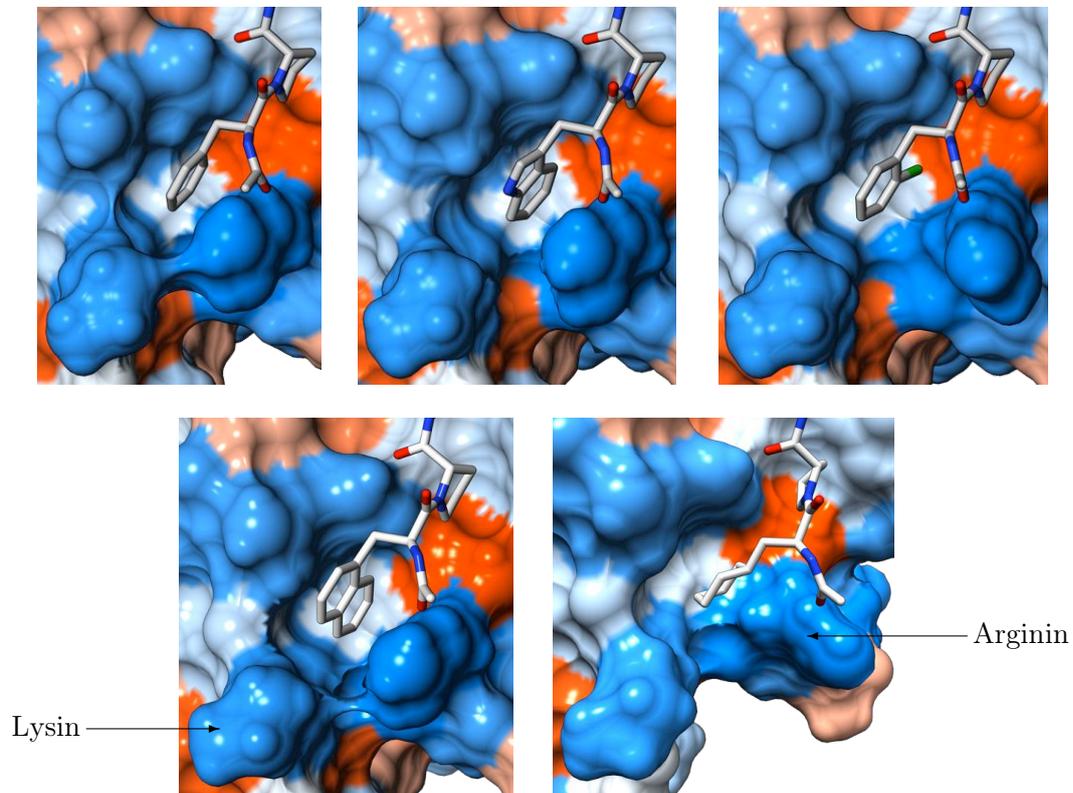


Abbildung 18.1.: Ersetzungen des an der Bindung beteiligten Phenylalanins des ActA-Peptids. Oben, von links nach rechts: Phenylalanin, Tryptophan, 2-Chlor-Phenylalanin. Unten, von links nach rechts: 1-Naphtylalanin, 2-Naphtylalanin. Die Hydrophobizität der Proteinoberfläche ist wieder farbkodiert wiedergegeben worden: Dunkelblau stellt die höchste Hydrophilie, orange die höchste Hydrophobizität dar. Das Arginin ist in der Lage eine Kation- $\pi$  Wechselwirkung mit dem aromatischen Ring auszubilden.

des Pyridins, welche auch geladene Grenzstrukturen enthält, sich hier ungünstig auf die Bindung auswirkt: die Hydrophobizität des Pyridylrestes ist bekanntlich geringer als die des Phenylalaninrestes. Das gleiche gilt auch für die Kation- $\pi$ -Wechselwirkung [80].

Das Chlor des 2-Chlor-Phenylalanin scheint eine verbleibende Stelle in der Phe-Bindungstasche auszufüllen, was ausreicht die freie Enthalpie um mehr als 6 kJ/mol gegenüber dem Phenylalanin zu verringern (siehe Abb 18.2). Die Kation- $\pi$  Wechselwirkung für 2-Chlor-Phenylalanin sollte kleiner als für Phenylalanin sein, da das Chlor wegen seiner höheren Elektronegativität elektronenziehend ist und es durch den induktiven Effekt zu einer anderen Ladungsverschiebung als für den Phenylrest kommt [80, 107]. D. h. die Affinität wird hier stärker durch die hydrophobe Wechselwirkung bestimmt. Es stellt sich die Frage, ob 2-Methyl-Phenylalanin eine bessere Ersetzung als 2-Chlor-Phenylalanin sei: die Kation- $\pi$  Wechselwirkung wäre hier stärker als für 2-Chlor-Phenylalanin [107] und gleichzeitig sollte die starke hydrophobe Wechselwirkung des Chlors durch den Methylrest ersetzt werden können.

## **18.2. Weitere mögliche interessante Ersetzungen des bindungsrelevanten Phenylalanins**

Aus unserer Analyse der Bindungsverhältnisse für das an der Bindung beteiligte Phenylalanin leiten wir folgende, weitere interessante Ersetzungen für das Phenylalanin ab (siehe auch Abb. 18.3 und 18.2):

- 2-Methyl-Phenylalanin – sollte die hydrophobe und die Kation- $\pi$ -Wechselwirkung gegenüber Phenylalanin verstärken und könnte besser als 2-Chlor-Phenylalanin binden [107].
- $\alpha$ -Methyl-Phenylalanin bzw.  $\alpha$ -Methyl-2-Chlor-Phenylalanin – Die Ersetzung des  $\alpha$ -Wasserstoffs mit einem Methylrest könnte die hydrophobe Wechselwirkung erhöhen, da der  $\alpha$ -Wasserstoff in Richtung des Val88 des VASP-EVH1 zeigt.
- $\beta$ -(1-Azulenyl)-L-Alanin [76] – könnte die gleich starke hydrophobe Wechselwirkung und eine stärkere Kation- $\pi$ -Wechselwirkung als 1-Naphtylalanin zeigen [80].
- 4-Methyl-Tryptophan – könnte die hydrophoben und Kation- $\pi$ -Wechselwirkung gegenüber Tryptophan verstärken.
- 4-Chlor-Tryptophan – könnte die hydrophobe Wechselwirkung gegenüber dem Tryptophan verstärken.

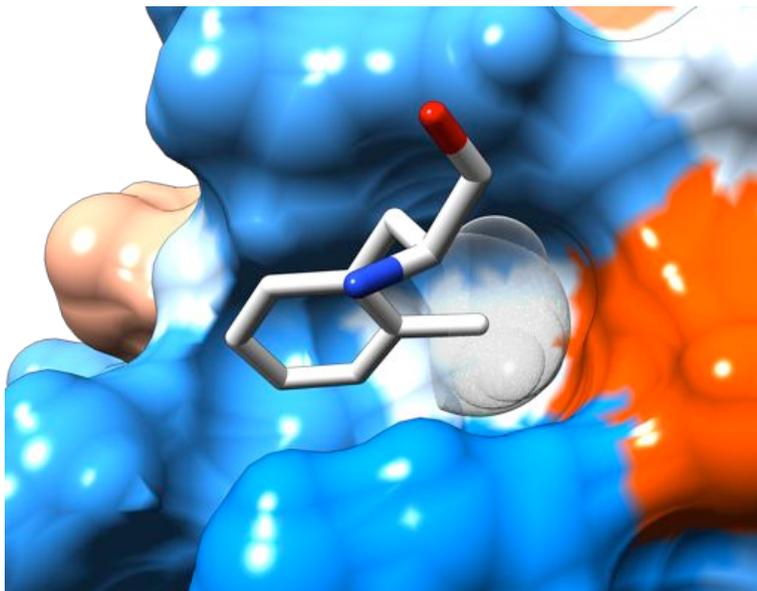
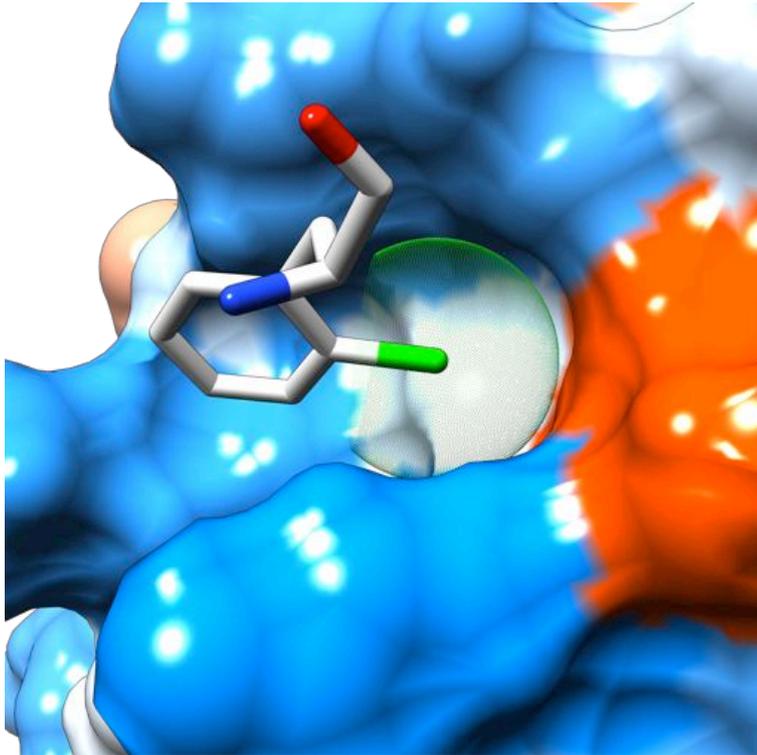


Abbildung 18.2.: Das Chlor des 2-Chlor-Phenylalanin füllt eine Tasche aus. Möglicherweise lässt sich der selbe Effekt auch durch 2-Methyl-Phenylalanin erreichen. Zusätzlich könnte das die vermutetet Kation- $\pi$  Wechselwirkung zwischen dem aromatischen Ring und dem Arg81 des VASP-EVH1 verstärken.

- 2-Amino-5-Chloro-4-Oxopentanoic acid – Diese Ersetzung ist eine Reduktion auf die hydrophobe Wechselwirkung des Chlors.
- Leucin-Derivate: 5,5,5-Tri-Chlor-Leucin und 2-Amino-6,6-Dichloro-4-Methylhex-5-enoic acid [45, 3] – Auch diese Ersetzungen sollten die Bindung auf die hydrophobe Wechselwirkung reduzieren.
- 7-Aza-Tryptophan – sollte wie 2- und 3-Pyridylalanin die Bindung verschlechtern und wäre als ein Test der Bindungshypothese zu verstehen.

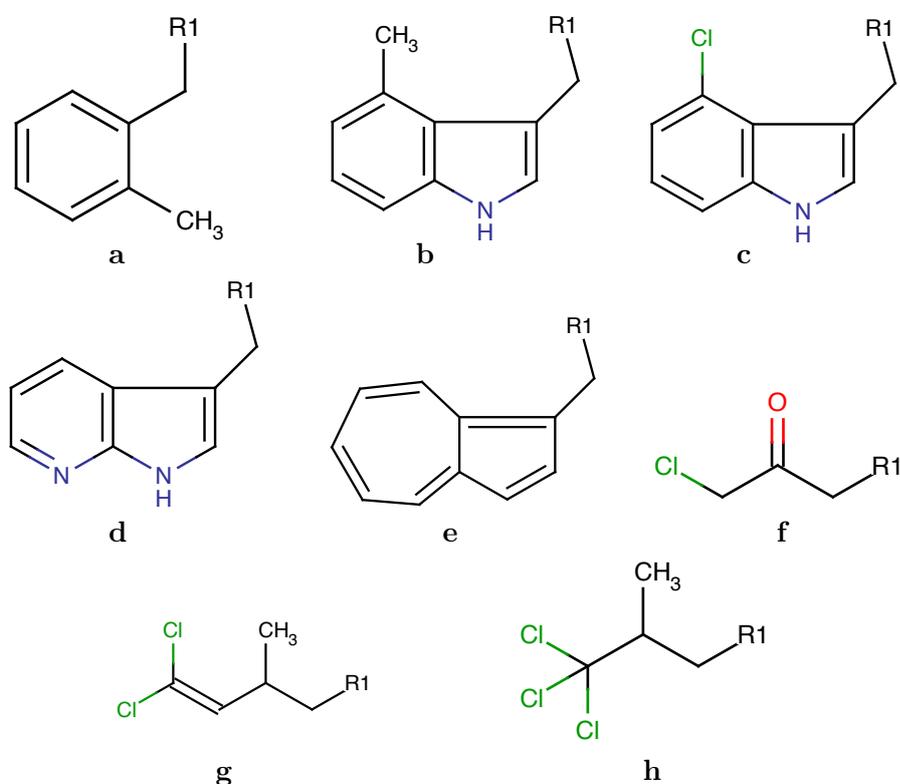


Abbildung 18.3.: Mögliche andere Ersetzungen des bindungsrelevanten Phenylalanins: a) 2-Methyl-Phenylalanin, b) 4-Methyl-Tryptophan, c) 4-Chlor-Tryptophan, d) 7-Azatryptophan, e) β-(1-Azulenyl)-Alanin, f) 2-Amino-5-Chloro-4-Oxopentanoic acid, g) 2-Amino-6,6-Dichloro-4-Methylhex-5-enoic acid, h) 5,5,5-Trichlor-Leucin. Dargestellt ist nur der Seitenrest.

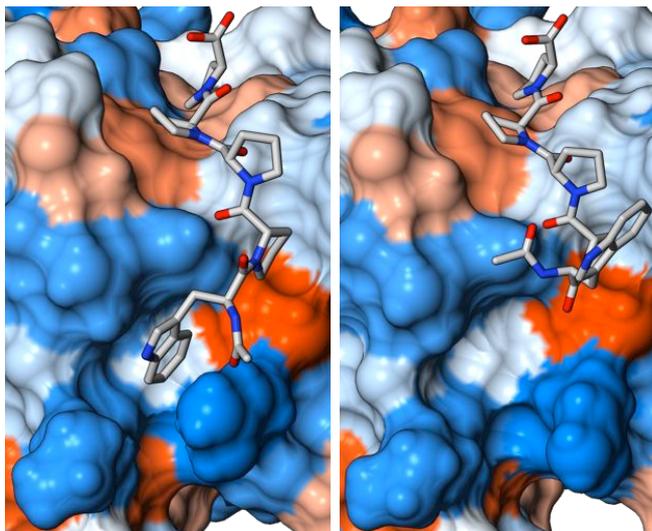


Abbildung 18.4.: Beispiel für den Einfluss der cis-trans Isomerie von Trp-Pro auf die Bindung. Links das trans- und rechts das cis-Isomer. Das cis-Isomer sollte nicht besser binden, als wenn das Tryptophan durch Alanin ersetzt würde.

### 18.3. Cis/Trans-Isomerie

Sowohl für den Trp-ActA, als auch den (1-Nal)-ActA Liganden fanden wir, im Gegensatz bpsw. für den ActA und den (2Cl-Phe)-ActA Liganden, in der ITC ein sehr langsames Zurückkehren ins Gleichgewicht der Baseline nach der Injektion dieser Liganden (siehe Abb. 14.4). Zusätzlich fanden wir in der LC/MS für den ActA, Trp-ActA und verschiedene X-enhaltene ActA-Chimären eine Aufspaltung in zwei Peaks, die wiederum dieselbe Masse besaßen (siehe Abb. 14.3). Wir interpretieren das als den Einfluss der cis/trans-Isomerie von Xaa-Pro Paaren auf die Konformation des Liganden und damit auf die Geschwindigkeit der Einstellung des Gleichgewichtes der Bindung und auf die Laufeigenschaften der Liganden in der LC/MS. Dabei ist das Prolin hier das erste Prolin des PRMs und Xaa eine beliebige Aminosäure die das bindungsentscheidene Phenylalanin ersetzt. Wir vermuten daher auch, dass das trans-Isomer mit einer weitaus höheren Affinität an VASP-EVH1 bindet, als das cis-Isomer (siehe Abb. 18.4). Dazu passt die von uns ermittelte Umfaltungsgeschwindigkeit des Trp-ActA Liganden in seine bindungsfähige Konformation mit  $k = 9,7(0,3) \times 10^{-4} \text{ 1/sec}$  (siehe auch Seite 117 dieser Arbeit). Dieser Wert passt gut zur cis/trans Umwandlungsgeschwindigkeit von  $k_{c \rightarrow t} \approx 5 \times 10^{-4} \text{ 1/sec}$  für Trp-Pro, wie sie von Fischer berichtet wurde [39], wobei dort bei 4°C und wir bei 25°C gemessen hatten.

Die cis/trans Isomerie des ersten Prolins und der vorgelagerten Aminosäure hat vermutlich einen wesentlich stärkeren Effekt, als die cis/trans Isomerie der Polyprolinsequenz: Obwohl der Diprolinbaustein X eine fixierte PPII-Konformation aufweist, sehen wir keine Änderung in den thermodynamischen Daten für die PXP-Chimäre (siehe Tab. 20.2 und 20.3). Die niedrigere bzw. höhere Affinität der XPP- bzw. PPX-Chimäre beruht vermutlich auf der Interaktion der Vinylbrücke mit der Proteinoberfläche und weniger auf der fixierten PPII-Konformation. Ausserdem wird von Fischer der cis-Anteil von Pro–Pro als der kleinste von allen Xaa–Pro Paaren angegeben, wobei Xaa eine proteinogene Aminosäure ist (siehe auch Abb. 4 in [39] bzw. Abb. 20 in [31]). D. h. die PPII-Helix ist energetisch gegenüber der PPI bevorzugt.

Besonders groß und damit für uns ungünstig wird der cis-Anteil für große aromatische Seitenreste für die dem Prolin vorgelagerte Aminosäure, wobei dann auch gleichzeitig die Umwandlungsgeschwindigkeit  $k_{c \rightarrow t}$  klein wird. So hat Trp–Pro von allen proteinogenen Aminosäuren den höchsten cis-Anteil, gefolgt von Tyr–Pro und Phe–Pro [39], und gleichzeitig die niedrigste Umwandlungsgeschwindigkeit. Es ist zu vermuten, dass der störende cis-Anteil für (1-Nal)–Pro sogar höher und die Umwandlungsgeschwindigkeit niedriger als für Trp–Pro ist. Dabei sind besonders große aromatische Reste als Ersetzung des bindungsentscheidenden Phe des ActA-Peptids von Vorteil (siehe Tab. 20.8), aber gleichzeitig kinetisch besonders ungünstig. In dem Zusammenhang sind auch die großen Unterschiede in der  $K_D$  zwischen FT und ITC für das Ac–SFEWPPPP–T–NH<sub>2</sub> und seiner Derivate zu sehen (siehe Tab. 20.25). So war für die FT die Zeit zwischen zwei Injektionen eine Minute, für die ITC mindestens 20 Minuten lang. Für die FT lag daher kein Gleichgewicht vor, weswegen die Konzentration an bindungsfähigem Ligand geringer und die  $K_D$  daher größer als für die ITC war.

Nach [39, 31] ist der Anteil des cis-Isomers mit bis zu 25 % für Phe–Pro der drittgrößte, nach Trp–Pro und Tyr–Pro Paaren, was sich anscheinend auch in der LC/MS zeigt (siehe Abb. 14.3). Dabei ist die Umwandlungsgeschwindigkeit für Phe–Pro von cis zu trans größer als für Trp–Pro und Tyr–Pro [39, 31]. D. h. auch für das Phenylalanin – und sicher auch für das 2-Chlor-Phenylalanin – wird die cis/trans Isomerie eine Rolle spielen. Die erste Konsequenz der Xaa–Pro cis/trans Isomerie ist, dass die Reaktionsgleichung (7.1) nur eine erste Näherung sein kann. Wobei wir aber davon ausgehen können, dass die Stöchiometrie  $n$  in (7.1) gleich eins gesetzt werden kann (siehe z. B. Tab. 20.5). Im Nachfolgenden wollen wir den Einfluss der cis/trans Isomerie auf das beobachtete Gleichgewicht des Protein-Ligand-Komplexes und die Konsequenz für das Design höheraffiner und kinetisch günstiger Liganden darlegen.

## Einfluss der cis/trans Isomerie auf die Lage des Gleichgewichtes und Schlussfolgerungen

Eine bessere Annäherung für die Bindung der Liganden an VASP-EVH1 berücksichtigt das Vorliegen von zwei Populationen des freien Liganden: Die erste Population  $L^t$  bindet, und die zweite Population  $L^c$  bindet nicht an VASP-EVH1. Das Reaktionsschema für die Bindung an VASP-EVH1 lautet dann:



Die (intrinsische) Dissoziationskonstante für den Protein-Ligand-Komplex  $PL^t$  bestimmt sich dann zu:

$$K_D \equiv \frac{[P][L^t]}{[PL^t]} \quad (18.2)$$

Da bei der Reaktion keine der Edukte verbraucht wird, ist die totale Protein- bzw. Ligandkonzentration gegeben als (mit  $L$  als der freien Ligandkonzentration):

$$\begin{aligned} P_t &= P + PL^t \\ L_t &= \underbrace{L^c + L^t}_{=L} + PL^t \end{aligned} \quad (18.3)$$

Im Gleichgewichtsfall kann mit dem cis-zu-trans Verhältnis  $K_{ct} = [L^c]/[L^t]$  für die cis/trans Umwandlung des Liganden, für die totale Ligandkonzentration auch geschrieben werden:

$$L_t = [L^t](K_{ct} + 1) + [PL^t] \quad (18.4)$$

Die mit unseren Messmethoden beobachtete  $K_{D,obs}$  lautet dann nach einsetzen von (18.3) und (18.4) in (18.2) und umstellen:

$$K_{D,obs} = \frac{[P][L]}{[PL^t]} = \frac{(P_t - [PL^t])(L_t - [PL^t])}{[PL^t]} = K_D(K_{ct} + 1) \quad (18.5)$$

Die beobachtete  $K_{D,obs}$  ist daher nie kleiner als die intrinsische  $K_D$ , sondern eher größer. Liegt der Ligand z. B. zu gleichen Teilen als cis- und trans-Isomer vor, so ist die gemessene  $K_{D,obs}$  doppelt so groß wie die intrinsische  $K_D$ . Das Verhältnis  $K_{ct}$  der Tryptophan- oder 1-Naphthylalanin-Liganden ist wahrscheinlich größer als das der Phenylalanin- oder 2-Chlor-Phenylalanin-Liganden. D. h. die niedrigere Affinität der Tryptophan- und 1-Naphthylalanin-Liganden gegenüber den 2-Chlor-Phenylalanin-Liganden erklärt sich wenigstens teilweise aus dem unterschiedlichen Grad der cis/trans-Isomerie von Xaa-Pro

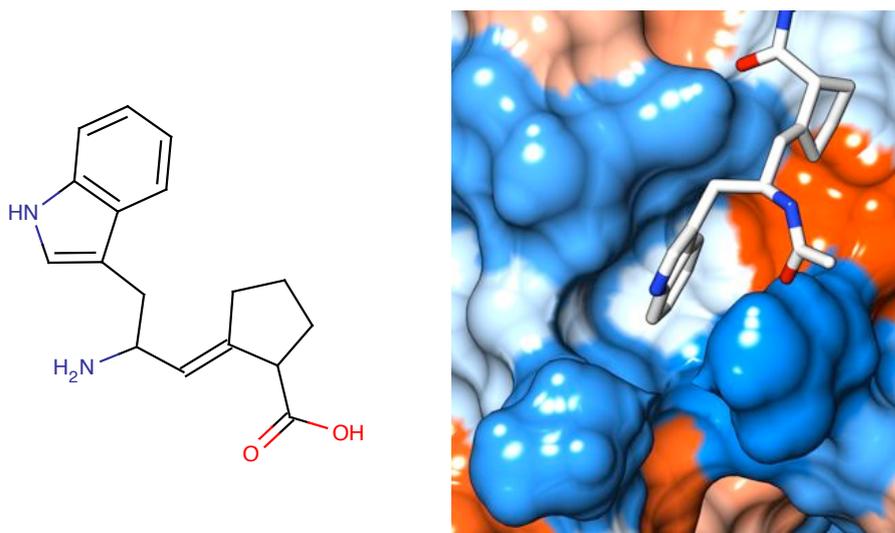


Abbildung 18.5.: Fixierung des Tryptophanrestes in der trans-Position durch Einführung eines Trp-Pro *E*-Alken Isoters.

Paaren.

Die beobachtete freie molare Reaktionsenthalpie ergibt sich, wenn wir  $K_{D,obs}$  in (7.6) einsetzen und umstellen:

$$\Delta G_{obs}^{\circ} = \Delta G_{int}^{\circ} + \Delta G_{ct}^{\circ} = \Delta G_{int}^{\circ} + RT \ln(K_{ct} + 1) \quad (18.6)$$

Dabei ist  $\Delta G_{int}^{\circ}$  die intrinsische freie molare Reaktionsenthalpie, die mit der Bildung des Protein-Ligand-Komplexes in Zusammenhang steht, wohingegen  $\Delta G_{ct}^{\circ}$  die freie molare Reaktionsenthalpie der cis/trans Umwandlung ist. Der Wert für  $\Delta G_{ct}^{\circ}$  ist nie negativ, da  $K_{ct}$  nie kleiner als null werden kann. D. h. analog zu  $K_{D,obs}$  ist  $\Delta G_{obs}^{\circ}$  nie größer als die intrinsische freie molare Reaktionsenthalpie  $\Delta G_{int}^{\circ}$ , sondern ist eher kleiner. Liegt der Ligand beispielsweise zu gleichen Teilen als cis- und trans-Isomer vor, so verringert sich die beobachtete  $\Delta G_{obs}^{\circ}$  gegenüber der intrinsischen  $\Delta G_{int}^{\circ}$  bei 25 °C um 1,7 kJ/mol.

Wäre es möglich, die trans-Konformation zu fixieren, sollte sich die gemessene  $K_{D,obs}$  der intrinsischen  $K_D$  annähern und daher kleiner werden. Eine, zumindestens sterisch denkbare, Möglichkeit wäre die Abwandlung des Trp-Pro, 1-Nal-Pro oder 2Cl-Phe-Pro Dipetides in ein entsprechendes *E*-Alken Isoster, wie es z. B. schon für Pro-Pro und Tyr-Tyr durchgeführt wurde [11, 12] (siehe auch Abb 18.5). Vorher sollte natürlich das Verhältnis  $K_{ct}$  für diese Liganden bestimmt werden, da dies Auskunft über die Höhe der zu erwartenden Reduzierung der freien Enthalpie liefert.

Es scheint auch die Möglichkeit zu existieren, dass die Spir2-Komponente, wenn sie

die ersten beiden Proline des ActA-Peptids ersetzt, die Isomerie des Liganden mehr in Richtung trans-Isomer verschiebt. So könnte die Wechselwirkung des Seitenrestes des bindungsentscheidenden Phenylalanins oder seiner Ersetzungen mit der Vinylbrücke des Spir2 eben das cis-Isomer energetisch ungünstiger werden lassen. Diese Spekulation ließe sich mit der Ermittlung von  $K_{ct}$  für diesen Liganden und das entsprechende Referenzpeptid erhärten.

## 18.4. Kombination der besten Ersetzungen für die Proline und das Phenylalanin – unsere besten Binder

**Unsere affinsten Liganden** Wir kombinierten unsere besten Ersetzungen für die Proline und das bindungsentscheidende Phenylalanin und erhielten mit **(a)** Ac-SFE-(2Cl-Phe)-(Spir2)X-TEDEL-NH<sub>2</sub> und **(b)** Ac-SFE-(Phe-2Cl)-PPX-TEDEL-NH<sub>2</sub> unsere bestbindenden Liganden mit einer nanomolaren  $K_D$  (siehe Tab 20.6). Der Ligand **(b)** bindet außerdem mit nanomolarer  $K_D$  an Enah-EVH1 (auch als Mena-EVH1 bekannt) und EVL-EVH1 (siehe Tab. 20.14), wobei er mit 210 (5) nM (FT) und 510 (6) nM (ITC) besser an Enah-EVH1 zu binden scheint, als das Miniaturprotein pGolemi, welches mit ca. 700 nM an Enha-EVH1 bindet [54, 46]. Dabei hatten unsere Ligand mit ca. 1,7 kDa natürlich ein geringeres Molekulargewicht als pGolemi mit ca. 3,5 kDa. Nach den *Supplementary Information* zur Arbeit von Holtzman et al. [54] bzw. Golemi-Kotra et al. [46] braucht die Bindung von pGolemi an die Domäne etwa 40 min bzw. 30 min bis sie das Gleichgewicht erreicht hat. Unsere bestbindenden Liganden erreichten das Gleichgewicht wesentlich schneller: In der ITC lag der Abstand zwischen zwei Injektionen bei 7,5 min, die Reaktion selbst war aber schon vorher abgeklungen<sup>2</sup>. Für die FT war der Abstand zwischen zwei Titrations nur ca. eine Minute lang.

**Gewinn an freier Enthalpie für die Ersetzungen** Betrachten wir den Unterschied  $\Delta\Delta G$  für alle Liganden mit dem PPX-Motiv bzw. mit 2Cl-Phe gegenüber dem PPPP-Motiv bzw. dem Phenylalanin, so ist der Einfluss des Chlors des 2Cl-Phe auf die Erhöhung der Affinität wesentlich größer, als der der Vinylbrücke des X-Bausteins (siehe Tab. 18.1). Da das gebundene ActA-Peptid und seine in Tab. 18.1 aufgeführten Derivate keine intramolekularen Interaktionen aufweisen und diese ActA-Peptid-Derivate fast identisch wie das ActA-Peptid binden, sind die aufgeführten Änderungen auch praktisch unabhängig voneinander und können additiv betrachtet werden. Mitteln wir über alle Ersetzungen, so erhalten wir die beste Schätzung für den Gewinn  $\Delta\Delta G$  an freier Enthalpie für das

<sup>2</sup>Die Mindestzeit zwischen zwei Titration liegt für die VP-ITC von MicroCal üblicherweise bei 6 min.

PPX-Motiv mit 2,7 (0,4) kJ/mol und das 2Cl-Phe mit 6,3 (0,3) kJ/mol (siehe Tab. 18.1). So gewinnen wir insgesamt 9,2 (0,9) kJ/mol an freier Enthalpie für den besten Binder (**b**) gegenüber dem ActA-Peptid. Wir erhalten den gleichen Betrag, wenn wir die Mittelwerte in  $\Delta\Delta G$  für das PPX-Motiv und 2Cl-Phe addieren (siehe Tab. 18.1), was wir als Beleg für die schon angeführte Additivität der Ersetzungen und die Abwesenheit von intramolekularen Interaktionen der an VASP-EVH1 gebundenen Liganden sehen.

**Der Ligand (b) stabilisiert die Konformation des VASP-EHV1** Unser bester Binder (**b**) stabilisiert das VASP-EVH1 in seiner nativen Konformation, wie wir mittels CD-Schmelzkurven und DSC-Experimenten zeigen konnten (siehe Abb. 14.7). Dabei scheint unser bester Binder (**b**) die Schmelztemperatur des VASP-EVH1 um ca. 8°C zu erhöhen, und hat damit einen stärkeren Einfluss als das ActA-Peptid, welches die Schmelztemperatur nur um ca. 4°C erhöht. Das begründet sich vermutlich aus der höheren Affinität des bestbindenden Liganden (**b**), und zeigt, dass er an das native Protein bindet.

**Unterschiede in der  $K_D$  für die FT und ITC** Für alle Liganden mit dem PPX-Motiv fanden wir eine Differenz zwischen der mittels Fluoreszenz (CVM/FT) und mittels ITC ermittelten Affinität, unabhängig von der verwendeten Aminosäure für das bindungsrelevante Phenylalanin. Ebenso fanden wir für dieses Motiv eine Erhöhung der Enthalpie und eine Verringerung der entropischen Energie im Vergleich zum ActA-Peptid (vergleiche Tab. 20.2 und 20.11). Den Affinitätsunterschied interpretierten wir damit, dass wir für die Fluo-Daten lediglich die Änderungen in der Umgebung des Trp23 beobachten, während wir für die ITC alle Prozesse beobachten, die den Wärmehalt der ITC-Zelle ändern. D. h. für die ITC beobachten wir eine Summe aus wesentlich mehr Prozessen, als für die Fluoreszenz.

Als wesentlich für die Erhöhung der Affinität durch das PPX-Motiv sehen wir die Fixierung des X-Bausteins über die Interaktion der Vinylbrücke mit dem aromatischen Ring des Phe79 des VASP-EVH1 an. Dadurch wird das zentrale Kernmotiv stabilisiert, das sonst als Polyprolinsequenz für die letzten beiden Proline schwächer gebunden wäre (siehe auch Abb. 17.3). Daher bindet das PPX-Motiv stärker an/um das Trp23, als das PPPP-Motiv, was wir dann mittels Fluoreszenz exklusiv beobachten. Andere bei der Bindung ablaufenden, und mittels ITC beobachteten, Prozesse, sind für die Fluoreszenz unsichtbar.

Für die, um die flankierenden Epitope SFE und EDEL, verkürzten Peptide, sollte sich die mittels ITC bestimmte Affinität der der Fluoreszenz annähern.

Referenz vs. Derivat	$\Delta\Delta G$ in kJ/mol			Addition
	Fluo	ITC	Mittelwert	
Ac-SFEF <b>PPPP</b> <sub>TEDEL-NH<sub>2</sub></sub> vs. Ac-SFEF <b>PPX</b> <sub>TEDEL-NH<sub>2</sub></sub> (Tab. 20.3)	-3,0 (0,3)	-2,5 (0,2)		
Ac-SFEW <b>PPPP</b> <sub>TEDEL-NH<sub>2</sub></sub> vs. Ac-SFEW <b>PPX</b> <sub>TEDEL-NH<sub>2</sub></sub> (Tab. 20.8, 20.11)	-5 (1)	-1,8 (0,3)	-2,9 (0,5)	
Ac-SFE(2Cl-Phe) <b>PPPP</b> <sub>TEDEL-NH<sub>2</sub></sub> vs. Ac-SFE(2Cl-Phe) <b>PPX</b> <sub>TEDEL-NH<sub>2</sub></sub> (Tab. 20.8, 20.11)	-3,7 (0,7)	-1,8 (0,2)		-9,2 (0,6)
Ac-(2Cl-Phe) <b>PPPP</b> <sub>(2Cl-Phe)-NH<sub>2</sub></sub> vs. Ac-(2Cl-Phe) <b>PPX</b> <sub>(2Cl-Phe)-NH<sub>2</sub></sub> (Tab. 20.26)	-	-2,6 (0,6)		
Ac-SFE <b>F</b> PPPPTEDEL-NH <sub>2</sub> vs. Ac-SFE( <b>2Cl-Phe</b> )PPPPTEDEL-NH <sub>2</sub> (Tab. 20.9)	-6,4 (0,6)	-6,6 (0,2)		
Ac-SFE <b>F</b> PPXTEDEL-NH <sub>2</sub> vs. Ac-SFE( <b>2Cl-Phe</b> )PPXTEDEL-NH <sub>2</sub> (Tab. 20.12)	-7,1 (0,4)	-5,9 (0,2)	-6,3 (0,3)	
Ac- <b>F</b> PPPPTEDEL-NH <sub>2</sub> vs. Ac-( <b>2Cl-Phe</b> )PPPPTEDEL-NH <sub>2</sub> (Tab. 20.15, 20.21)	-5,7 (0,2)	-		
Ac-SFE <b>F</b> PPPPTEDEL-NH <sub>2</sub> vs. Ac-SFE( <b>2Cl-Phe</b> )PPXTEDEL-NH <sub>2</sub> (Tab. 20.2, 20.11)	-10,1 (0,5)	-8,4 (0,2)	-9,2 (0,9)	

Tabelle 18.1.: Zunahme von  $\Delta\Delta G$  für die Ersetzung des Phenylalanin durch 2-Chlor-Phenylalanin und die Ersetzung der letzten zwei Proline mit dem Diprolinbaustein.

**Selektivität** Unser bestbindender Ligand (**b**) ist promisk. Er scheint aber an Enah- und EVL-EVH1 etwas besser als an VASP-EVH1 zu binden (siehe Tab. 20.14). Dieses Muster fand Holtzman et al. auch für das ActA<sub>11</sub>-Peptid DFPPPPTDEEL [54]. Es scheint nur natürlich zu sein, dass es dem Bakterium *Listeria monocytogenes* nicht darauf ankommt, welche EVH1-Domäne konkret vom ActA-Protein rekrutiert wird, da VASP, Enah und EVL ähnliche Funktionen erfüllen [78].

Jedoch fand Holtzman et al. Selektivität für die EVH1-Domänen mit den dort verwendeten Miniproteinen pGolemi ( $K_{D, \text{Enah}} \ll K_{D, \text{VASP}} \ll K_{D, \text{EVL}}$ ) und pGol-2 ( $K_{D, \text{EVL}} = K_{D, \text{VASP}} \ll K_{D, \text{Enah}}$ ). Allerdings ist die hohe Affinität auf das jeweilige Miniprotein beschränkt. So hat die Bindungssequenz von pGolemi (PFPPTPPGEEA) als freies Peptid nur eine geringe Affinität [46]. Die Affinität der Bindungssequenz von pGol-2 (EFPQP-PYPGEDAP) als freies Peptid wurde von Holtzman et al. leider nicht untersucht. Wie auch immer, die Arbeiten zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, die EVH1-Domänen von VASP, Enah und EVL selektiv zu adressieren. Für uns interessant ist der Austausch der nicht direkt an der Bindung beteiligten mittleren Proline des Kernmotivs, wobei für pGolemi das Kernmotiv FPPTP und pGol-2 FPQPP lautet. Unter Umständen werden hier die wenigen Differenzen in den Sequenzen der drei Domänen ausgenutzt. So haben bspw. VASP- und EVL-EVH1 in ihren Strukturen an der Bindungsoberfläche des Liganden an der selben Stelle ein Prolin (Pro77 bzw. Pro71), wohingegen Enah-EVH1 dort ein Glutamin hat (Gln74). Das könnte die FPPTP-Sequenz des Kernmotivs von pGolemi erklären und einer der Gründe der Selektivität dieses Miniproteins sein: Womöglich kommt es zu einer Interaktion zwischen dem Threonin und dem Gln74 für Enah-EVH1, wohingegen das Threonin für VASP- und EVL-EVH1 diese Interaktion nicht macht und dann eher störend für die Bindung wirkt.

Diese Spekulation zeigt einen der möglichen Wege zum Auffinden selektiver Liganden für die drei EVH1-Domänen, der sich darüber hinaus im Rahmen des rationalen Designs abhandeln lassen könnte: (i) wir ermitteln  $\Delta\Delta G$  für die Varianten des Kernmotivs von pGolemi bzw. pGol-2 zu einem entsprechendem Referenzpeptid für alle drei EVH1-Domänen, (ii) sollten sich signifikante Differenzen ermitteln lassen, werden Kristallstrukturen des Protein-Ligand-Komplexes erstellt, wie es bereit für Enah- und EVL-EVH1 geschehen ist [93, 36], (iii) aus dem Studium der Strukturen können sich dann weitere Verbesserungsmöglichkeiten ergeben.

Alternativ oder ergänzend könnte auch ein Screen mittels eines Spotarrays analog zu unserer Suche nach einer besseren Ersetzung für das bindungsentscheidende Phenylalanin angesetzt werden. Dabei könnten die beiden mittleren Proline des Kernmotivs FPPPP nacheinander mit allen natürlichen und für den Spotarray verfügbaren unnatürlichen

### *Diskussion – Ersetzung des Phenylalanins*

Aminosäuren ersetzt und für die drei EVH1-Domänen untersucht werden. Hierbei ist von Vorteil, dass uns mit P1 und P2 wenigstens zwei verschiedene Sequenzvariationen zur Verfügung stehen, mit denen wir uns im Bereich der Cutoff- $K_D$  des Spotarrays bewegen können (siehe auch Abb. 14.1).



# 19. Behandlung der flankierenden Epitope des ActA-Peptids: Verringerung des Molekulargewichtes

Wir haben bis hier nur nach Ersetzungen für die Proline und das bindungsentscheidende Phenylalanin gesucht und auch gefunden. Die flankierenden Epitope des Kernmotivs FPPPP des ActA-Peptids haben allerdings einen entscheidenden Einfluss auf die Affinität, wie bereits in der Literatur dargelegt wurde [93, 9]. In diesem Abschnitt beschäftigen wir uns nun zum einen mit der Untersuchung von Ersetzungen des N- und des C-terminalen flankierenden Epitopes, und stellen dann unsere verkürzten Liganden vor.

## 19.1. N-Terminale Variationen

Die Verkürzungen des ActA-Peptids um die ersten drei Aminosäuren Ser–Phe–Glu führt zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Affinität (siehe Tab. 20.15, 20.16 und 20.17), wie sie auch in [9] beobachtet wurde, sofern der N-Terminus der verbleibenden Sequenz acetyliert war. Ist der N-Terminus dagegen frei, nimmt die Affinität noch einmal stark ab (siehe Tabellen 20.15, 20.16). Dieses Verhalten ist erklärlich, da der freie N-Terminus positiv geladen ist und sich in der Nähe eines – ebenfalls positiv geladenen – Arginins befindet (Arg83 in VASP-EVH1 in **1jng**, Arg81 in Enah-EVH1 in **1evh**, Arg 82 in EVL-EVH1 in **1qc6**; siehe auch Abb. 19.1). Dieses Arginin bildet, mit anderen Aminosäureresten, die Tasche aus, in der der Phenylalaninrest eintaucht. Der Guanidylrest könnte darüber hinaus mit dem aromatischen Rest des bindungsentscheidenden Phenylalanins eine Kation- $\pi$ -Wechselwirkung eingehen (siehe Tab. 14.1 und Abschnitt *Ersetzungen für das bindungsentscheidenden Phenylalanins* auf Seite 147 dieser Arbeit). Durch die elektrostatische Abstoßung wird die Bindung des wichtigen Phenylalanins natürlich gestört (siehe Abb. 19.1).

Statt eines positiven oder ungeladenen N-Terminus könnte die Einführung einer negativen Ladung die verlorene Affinität des N-terminal verkürzten Peptids gegenüber dem ActA-Peptid wiederherstellen, ohne das Molekulargewicht übermäßig zu erhöhen. Dabei

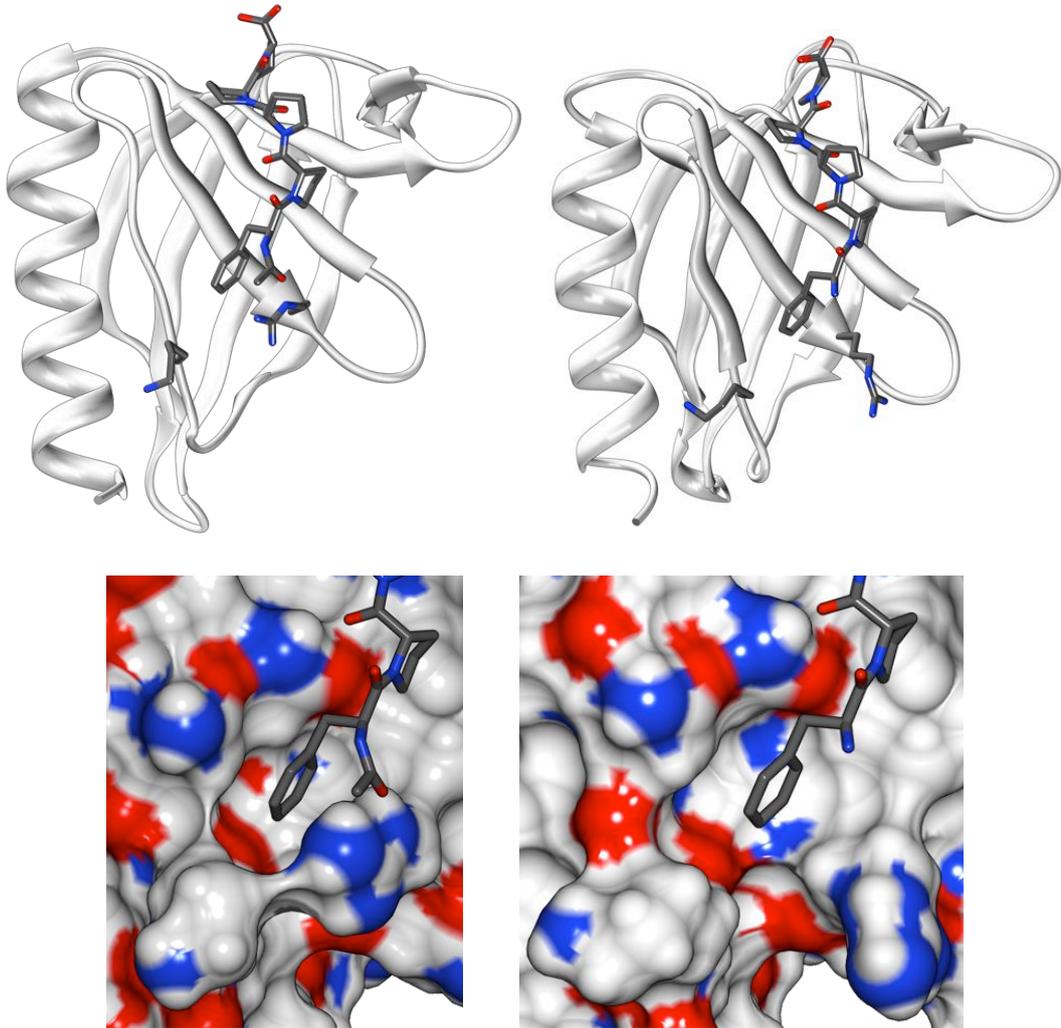


Abbildung 19.1.: Einfluss des acetylierten (links) und des freien (rechts) N-Terminus auf die Bindung. Der freie N-Terminus des verkürzten ActA-Peptids ist negativ geladen und es kommt zu einer elektrostatischen Abstoßung des Guanidylrestes des an der Bindung beteiligten Arginins der Domäne. Dadurch kann sich die vermutete  $\pi$ -Kation Wechselwirkung zwischen dem aromatischen Ring des Liganden und der positiven Ladung des Arginins nicht ausbilden, was die Affinität verringert.

könnte der N-Terminus mit einer difunktionellen Carbonsäure (Oxal-, Malon-, Bernsteinsäure usw.) umgesetzt werden (siehe Abb. 19.2). Ein anderer Weg wäre ein Phenylalanin-Derivat zu erzeugen, bei dem die Aminofunktion durch einen entsprechenden Carbon-säurerest ersetzt wird (siehe Abb. 19.2).

Wir setzten den N-Terminus des ActA-Peptids und seiner N-terminalen Verkürzungen mit Dansylchlorid um und stellten fest, dass der Dansylrest, in Abhängigkeit seiner Position, entweder keine Änderung der Affinität bewirkt (Dansyl ersetzt das Serin) oder aber die Affinität gegenüber den entsprechenden verkürzten und acetylierten Peptiden erhöht (siehe Tab. 20.18, 20.19). Der Dansylrest gab uns zusätzlich die Möglichkeit die Konzentration der entsprechenden Liganden spektroskopisch zu bestimmen, was ein Vorteil gegenüber der Konzentrationsbestimmung über die Einwaage ist. Zusätzlich vorteilhaft ist der Resonanzenergie transfer vom Tryptophan auf das Dansyl: für die beobachtete Emissionswellenlänge von 340 nm wirkt der dansylierte Ligand wie ein statischer Quencher. Dadurch können wir den effektiv zur Verfügung stehenden Messbereich der Fluoreszenzintensität voll ausschöpfen und reduzieren so das Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Das könnte auch interessant für zukünftige Bestimmungen der  $K_D$  eines Liganden anhand der Verdrängung eines dansylierten Peptids werden, wobei wegen des besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses eine Anwendung in einem Mikrotiterplatten-Spektrometer möglich sein sollte.

Für das um Ser-Phe-Glu verkürzte Peptid ersetzten wir das Dansyl dann durch Naphthyl- und Benzoylsulfonylreste, aber auch durch Fmoc. Wir fanden stets eine Erhöhung der Affinität, gegenüber der Referenz, wobei Fmoc die stärkste Erhöhung erbrachte (siehe Tab. 20.20). Die Ersetzung des bindungsentscheidenden Phenylalanins mit 2Cl-Phe und die Umsetzung des N-Terminus des verkürzten Peptids mit Benzoylsulfonylchlorid ergab erstaunlicherweise keine Verbesserung gegenüber einer Acetylierung (siehe Tab. 20.21). Womöglich beruht die Erhöhung der Affinität durch die aromatischen Sulfonyl-Reste auf der stärkeren Verankerung des Phenylalanins an oder in der Nähe seiner Bindungsstelle, was die Dissoziationsgeschwindigkeit des Protein-Ligand-Komplexes verringert (oder auch die Assoziationsgeschwindigkeit erhöht), was wiederum für das Phe-2Cl unerheblich wird, da es wesentlich stärker als Phe bindet. Letztlich ist diese Frage ohne einer Analyse der Kinetik der Reaktion schwierig zu beantworten.

## **19.2. C-Terminale Variationen**

Die Affinität des ActA-Peptids hängt auch davon ab, ob der C-Terminus als freie Säure vorliegt oder amidiert ist (siehe Tab. 20.22, 20.23 und 20.24). Dabei ist die Affinität

Diskussion – Behandlung der flankierenden Epitope

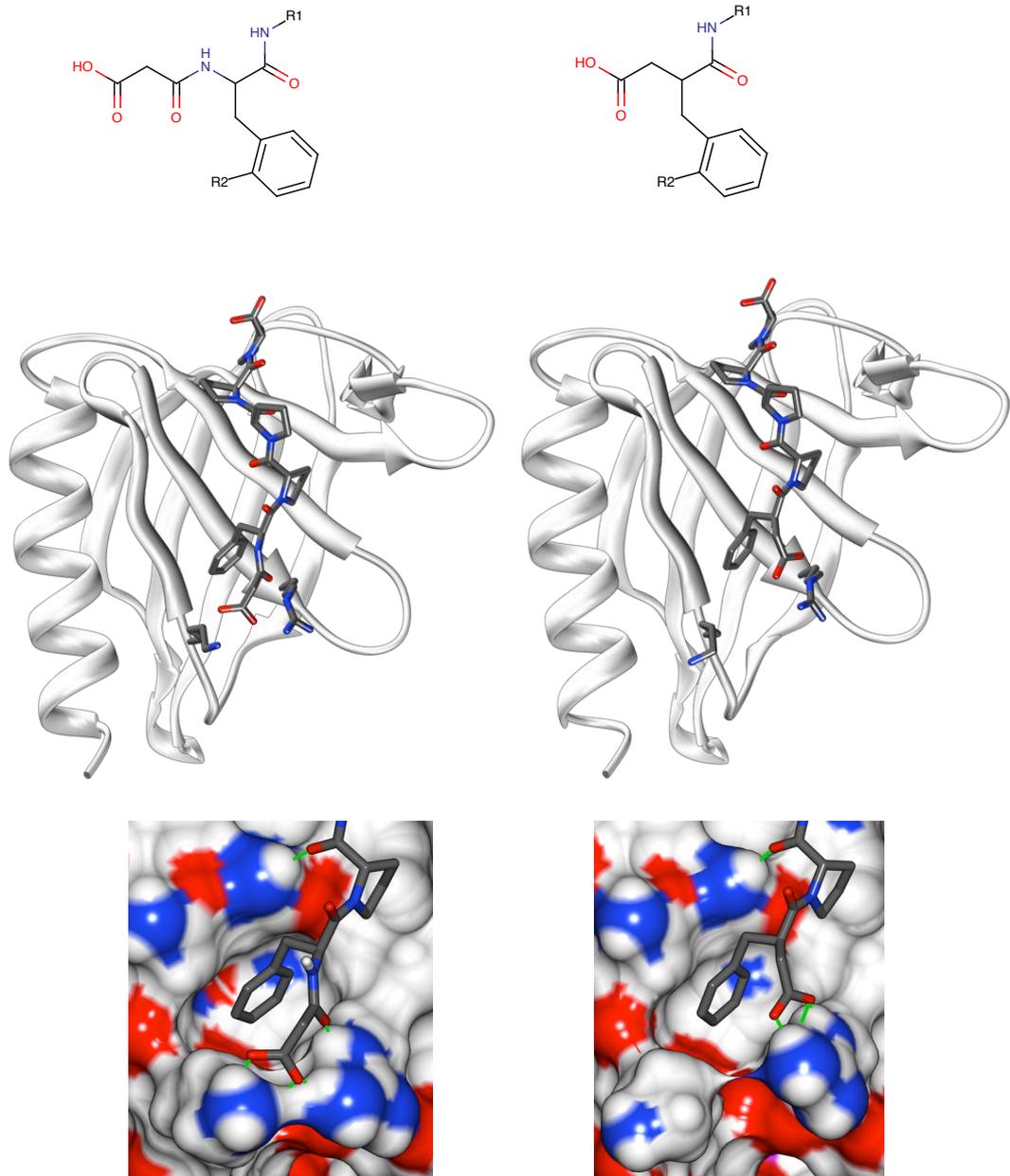


Abbildung 19.2.: Mögliche Interaktion eines eines modifizierten negativ geladenen N-Terminus eines EVH1-Inhibitors mit dem, für alle drei EVH1-Domänen charakteristischen, Arginin- und Lysinrest. *Links* ist die Aminofunktion mit der Dicarbonsäure Malonsäure umgesetzt, *rechts* wird das Phenylalanin durch ein Derivat ersetzt, welches an Stelle der Aminofunktion eine Carbonsäurefunktion enthält. Dabei befinden sich am Rest R1 die Proline bzw. Prolin-Mimetika, und am Rest R2 befindet sich ein Wasserstoff- oder Chloratom.

für das amidierte Peptid höher. Das korreliert mit den von Zimmermann et al. [121] bestimmten Affinitäten für das ActA-Peptid, bzw. des Derivates SFEWPPPTEDEL, wo Peptide ohne Acetylierung und Amidierung verwendet wurden. Aus der Arbeit von Ball et al. ist auch bekannt, dass das Leucin auf die Bindung einen Einfluss hat [9] und die Einführung einer Ladung die Bindung dieses wichtigen Leucins offensichtlich stört.

Wir suchten nun dieses Leucin, aber auch das gesamte C-terminale Epitop, mit anderen natürlichen und unnatürlichen Aminosäuren zu ersetzen (siehe Abb. 14.1). Dabei kamen zwei Sequenzen zum Einsatz: in der Sequenz P3 wird das Leucin ersetzt und in der Sequenz P4 wird das gesamte C-terminale Epitop TEDEL-NH<sub>2</sub> durch eine Aminosäure ersetzt. Dabei fanden wir, dass das Leucin, aber auch das gesamte Epitop durch praktisch jede Aminosäure ersetzt werden kann (außer 2-Pyridylalanin). Wir müssen allerdings kritisch anmerken, dass die Referenzsequenzen unglücklich gewählt waren. So bindet bspw. bereits die originale P3-Sequenz SFE-F-PPPTEDEL mit einer geringeren  $K_D$  als die Cutoff- $K_D$  des Spotarrays. D. h. jede mögliche Erhöhung, genauso wie jeder moderate Verlust an Affinität ist nicht sichtbar, da der Spot einfach nur schwarz bleibt. Für die P3-Sequenz hätte stattdessen die Sequenz SFE-L-PPPTEDEZ verwendet werden sollen, da hier mit der Ersetzung Z=Leucin fast genau der Umschlagpunkt des Spotarrays von schwarz nach weiß getroffen wurde (siehe auch P1 in Abb. 14.1, aber auch [9]).

Wie auch immer, da die vollständige Ersetzung des C-terminalen Epitopes die Bindung nur mäßig zu beeinflussen scheint, wählten wir verschiedene Aminosäuren als Ersetzung dieses Epitopes aus (siehe Tab. 20.25). Da nach Ball et al. die  $K_D$  des Ac-SFEFPPPPT-NH<sub>2</sub> bereits mit mehr als 200  $\mu$ M angegeben war, verwendeten wir Trp als Ersetzung des bindungsentscheidenden Phenylalanins, um die Affinität der Liganden für die Messung zu erhöhen. Zu diesem Zeitpunkt war uns 2Cl-Phe als bessere Ersetzung leider noch nicht bekannt. Die Folge daraus ist ein großer Unterschied zwischen den Fluo- und den ITC-Daten aufgrund der cis/trans Isomerie von Trp-Pro (siehe auch Abschnitt *Cis/trans Isomerie* auf der Seite 153 dieser Arbeit). Die Zeit zwischen zwei Injektionen war für die FT etwa eine Minute und für die ITC jedoch bis zu 30 Minuten lang. Für die FT-Daten können wir also nicht davon ausgehen, dass ein Gleichgewichtszustand vorliegt, daher ist die (apparente)  $K_D$  hier weit größer als für die ITC. Wie auch immer: durch den Verlust des EDEL-NH<sub>2</sub>-Restes verlieren wir mit etwa 6 kJ/mol sehr viel an Affinität gegenüber dem Referenzpeptid Ac-SFEWPPPTEDEL-NH<sub>2</sub>, wie es auch von Ball et al. für Ac-SFEFPPPPT-NH<sub>2</sub> gegenüber Ac-SFEFPPPTEDEL-NH<sub>2</sub> berichtet wurde [9]. Dabei ist die Bindung des EDEL-NH<sub>2</sub>-Restes offensichtlich als unabhängig von der Bindung des bindungsentscheidenden aromatischen Restes des ActA-Peptides zu sehen. Wir vermuten, dass die negativ geladenen Reste des EDEL-NH<sub>2</sub> Epitopes mit positiv geladenen

Resten des Arg22 (VASP-EVH1) bzw. Lys21 (Enah-EVH1) und Lys22 (EVL-EVH1) interagieren (siehe auch Abb. 13.4 und 13.5). Das könnte erklären, weshalb Glutamin- und Asparaginsäure in den EVH1-Bindungsstellen des C-terminalen flankierenden Epitopes von ActA, human Vinculin, chicken Vinculin, aber auch human Zyxin enthalten sind [99].

Die verwendeten Variationen des Threonins hatten nun selbst nur eine modulierende Wirkung auf die Bindung, aber keinen dramatischen Effekt (siehe Tab. 20.25), wie wir es für die Variationen des bindungsentscheidenden Phenylalanins fanden. Aufgrund der verfügbaren Kristallstrukturen für Enah-EVH1 und EVL-EVH1 vermuten wir, dass das Threonin von der Proteinoberfläche weg zeigt (siehe Abb. 19.3). Daher sollten die jeweiligen Seitenreste nur einen geringen Einfluss auf die Bindung haben. Dennoch scheint 2Cl-Phe, zumindest für die ITC-Daten, von allen Ersetzungen die stärkste Erhöhung in der Affinität zu haben.

Da wir eine Interaktion zwischen den Seitenresten der Glutamin- und Asparaginsäure des EDEL-NH<sub>2</sub>-Restes des ActA-Peptids mit dem Arg22 (VASP-EVH1) bzw. Lys21 (Enah-EVH1) und Lys22 (EVL-EVH1) vermuten, könnte die Einführung eines freien C-Terminus für das verkürzte ActA-Peptid die Affinität erhöhen. Es ist in diesem Sinne interessant anzumerken, dass bisher anscheinend nur verkürzte ActA-Peptide mit amidierten C-Terminus getestet wurden [93, 9], auch in dieser Arbeit. Es wäre daher für zukünftige Messungen interessant, die Affinitäten der Peptide Ac-SFE-(Phe-2Cl)-PPPP-T-NH<sub>2</sub> bzw. Ac-SFE-(Phe-2Cl)-PPPP-NH<sub>2</sub> mit den Affinitäten von Ac-SFE-(Phe-2Cl)-PPPP-T bzw. Ac-SFE-(Phe-2Cl)-PPPP zu vergleichen. Sollte die freie Säure einen positiven Einfluss auf die Bindung haben, könnte bspw.  $\beta$ -Alanin oder Taurin eine günstige Ersetzung für Threonin sein (siehe Abb. 19.3). So zeigt  $\beta$ -Alanin zwar im Spotarray nur eine schwache Färbung, jedoch liegt es dort auch nicht als freie Säure vor (siehe Abb. 14.1).

### 19.3. Beidseitige Verkürzungen

Durch Verwendung unserer besten Ersetzungen und Verkürzung des ActA-Peptids auf das Kernmotiv konnten wir das Molekulargewicht der Liganden reduzieren (von 1630 Da für den besten Binder (**b**) auf 750 Da), ohne dabei die  $K_D$  in den hohen dreistelligen mikromolaren Bereich zu treiben, wie sie für das Peptid Ac-FPPPPPT-NH<sub>2</sub> für VASP-, Enah- und EVL-EVH1 gefunden wurden [93, 9]. Vielmehr konnten wir Liganden finden, die genauso gut oder sogar besser als das ActA-Peptid banden (siehe Tab. 20.26 und 20.27). Hierbei sind vor allem die beiden Liganden Ac-(Phe-2Cl)-PPX-(Phe-2Cl)-NH<sub>2</sub>

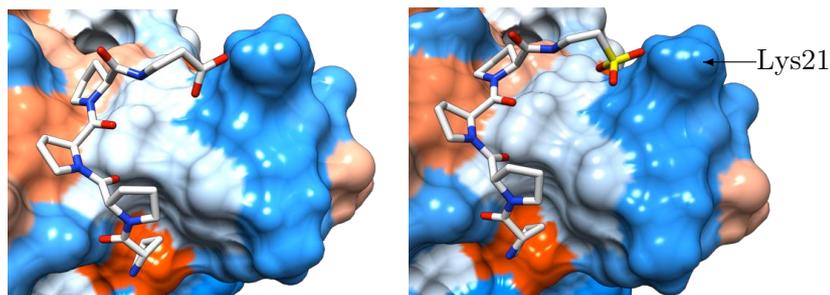


Abbildung 19.3.: Mögliche Verbesserung der Affinität des um TEDEL–NH verkürzten C-Terminus des ActA-Peptids durch Umsetzung mit  $\beta$ -Alanin (links) oder Taurin (rechts). Die negative Ladung des abgeänderten C-Terminus kann mit dem positiven Rest des Lys21 der Enah-EVH1-Domäne interagieren.

und Ac-(Phe-2Cl)-PPX-NH<sub>2</sub> zu nennen: ersterer bindet *besser* als, und zweiterer *genauso gut* wie das ActA-Peptid Ac-SFEF-PPPP-TEDEL-NH<sub>2</sub> an VASP-EVH1, ganz im Gegensatz zum nur sehr schwach bindenden Peptid Ac-FPPPT-NH<sub>2</sub> [9, 93]. Der Gewinn an freier Enthalpie durch die Vinylbrücke des X-Baustein und das Chlor des 2Cl-Phe sind also für die Bindung der verkürzten Liganden entscheidend (siehe Tab. 18.1).

Es begann allerdings auch die Löslichkeit der letzten beiden genannten Liganden ein (erwartetes) Problem zu werden. So bildete der Ligand Ac-(Phe-2Cl)-PPX-(Phe-2Cl)-NH<sub>2</sub> ein klebriges Pellet, wohingegen Ac-(Phe-2Cl)-PPX-NH<sub>2</sub> ein zentrifugierbares, aber nicht klebriges Pellet bildete. Der Effekt bewirkte einen Unterschied für die Fluo- und die ITC- $K_D$ : In der ITC konnten wir über den Faktor  $M$  des Modells (8.5) die Ligandkonzentration als anzupassenden Parameter ausweisen, wir mussten also die aktive Konzentration des Liganden nicht kennen. Für die Fluo-Daten war dagegen die Verwendung des Modells (8.5) nicht möglich, und damit auch die Anpassung der Ligandenkonzentration mittels des  $M$ -Faktors<sup>1</sup>. Daher waren die angesetzten nominellen Ligandkonzentrationen für die FT zu hoch. Nach den  $M$ -Werten aus der ITC waren die aktiven Ligandkonzentrationen der beiden fraglichen Liganden nur etwa halb so groß wie die nominelle Konzentration. Entsprechend sind die Werte der Fluo- $K_D$  auch etwa doppelt so groß, wie die ITC- $K_D$ , wobei die ITC- $K_D$  hier die besseren Schätzwerte darstellen.

Lag das verkürzte Peptid mit einem freien N-Terminus vor, so verringerte sich nicht nur die Affinität um etwa 4 kJ/mol, die Bindung war darüber hinaus auch rein Entropie

<sup>1</sup>Entweder führte die Verwendung von  $M$  zu einem singulärem Gradienten (für den Liganden Ac-(Phe-2Cl)-PPX-(Phe-2Cl)-NH<sub>2</sub>) oder der Fehler für die Schätzung der  $K_D$  war so hoch, dass der Datenfit nicht signifikant war (für den Liganden Ac-(Phe-2Cl)-PPX-NH<sub>2</sub>). Unter der Verwendung des Modells (8.5) lag die geschätzte  $K_D$  lag für letzteren Liganden bei ca. 20  $\mu$ M.

getrieben und bei 25 °C mittels ITC nicht messbar. Bei 8 °C war die Reaktion messbar, wobei allerdings Wärme verbraucht – statt wie bisher – produziert wird (siehe Tab. 20.26). Wir können damit für diesen Liganden die molare Reaktionswärmekapazität  $\Delta C_p$  grob auf etwa  $-300 \text{ J}/(\text{mol K})$  schätzen. Das negative Vorzeichen von  $\Delta C_p$  für dieser Ligand bedeutet, dass die Bindung dieses Ligand durch hydrophobe Effekte getrieben wird [47].

Die Störung der Bindung durch den freien N-Terminus scheint unsere These der Bindung des Phenylalanins zu entsprechen: Der positiv geladene N-Terminus und der Guanidylrest des Arg82 stoßen sich ab und verringern die Bindungsenergie, gleichzeitig sollte die vermutete Kation- $\pi$  Wechselwirkung gestört werden (siehe Abb. 19.1). Da das Peptid auch C-terminal keine negativ geladenen Aminosäuren wie das ActA-peptid hat, kann es nun „nur noch“ über seine beiden Wasserstoffbrücken und durch die Verringerung der hydrophoben Oberfläche an VASP-EVH1 binden.

## 20. Schlussfolgerungen

Den Protein-Protein-Interaktionen haftet, in einem pharmakologischen Sinne, immer noch das Stigma „undruggable“ an, wobei sich, auch im Lichte dieser Arbeit, die Frage stellt, ob dies nicht einfach nur ein Mythos sei. So ist das Ergebnis der vorliegenden Arbeit eben dieses, dass es nun sehr wohl möglich sei, hochaffine und relativ kleine Liganden für Protein-Protein-Erkennungsdomänen zu erzeugen, wobei sogar die als schwierig geltende Ersetzung von Polyprolinsequenzen mit einer Zunahme an Affinität gelang. Mehr noch, es scheint sich hier ein allgemeiner Weg zur Entwicklung von Liganden für die Inhibition von Protein-Protein-Interaktionen abzuzeichnen.

Als grosser Vorteil darf die Vereinfachung der Protein-Protein-Interaktion auf eine Protein-Peptid bzw. Proteindomäne–Peptid Interaktion gelten, wie sie bei den hier behandelten Proteindomänen möglich war. Dabei bindet das Peptid häufig als ein langgestrecktes Molekül auf das Zielprotein, wobei sich in den hier behandelten Fällen als zweiter Vorteil eine vernachlässigbare intramolekulare Wechselwirkung des Peptides erwies. Dadurch kann jede Aminosäure des Peptides separat behandelt werden und die Veränderung in der beobachteten freien Enthalpie der Peptidchimäre gegenüber dem Ausgangspeptid ergibt sich, wenigstens als erste Näherung, additiv aus den Änderungen in der freien Enthalpie der einzelnen abgeänderten Aminosäuren.

Die Möglichkeit der Reduktion einer Protein-Protein-Interaktion auf eine Protein-Peptid-Interaktion eröffnet gleichzeitig die Möglichkeit eines Computer unterstützten Liganden und Struktur basierten rationellen Designs, sofern die Strukturbestimmung des Protein-Peptid-Komplexes gelingt. Genau diese Kombination an Herangehensweisen führten zum X- und Spir2-Baustein und damit zu einem Erfolg insbesondere für die EVH1-Domänen von VASP, Enah und EVL. Darüberhinaus lässt sich so der klassische Weg der Erzeugung von Peptidomimetika, wie er bspw. in Klebes Lehrbuch „Wirkstoffdesign“ beschrieben wurde [69], auch für die Inhibierung von Protein-Protein-Interaktionen gewinnbringend einsetzen.

Wir wollen diese Erfahrung in einem Flussdiagramm zusammenfassen (siehe Abb. 20.1):

1. Einer der beiden Partner einer Protein-Protein-Interaktion muss als ein Peptid darstellbar sein. Vielfach kommt uns hier die Natur entgegen, da viele Protein-

Protein-Interaktion asymmetrisch sind. D. h, es wird ein besonders strukturiertes Protein, bzw. eine Domäne eines Proteins, benötigt, um eine spezielle und meist recht kurze Sequenz eines anderen Proteins zu erkennen. Lässt sich eine derartige Reduktion nicht durchführen, kann, bspw. mittels Phage-Display, versucht werden, eine kompetitive Peptidsequenz zu finden, die eine solche Funktion erfüllt [102, 37, 27].

2. Das verwendete Modell der Protein-Protein-Interaktion sollte optimiert sein. So ist bspw. häufig nicht das gesamte Protein notwendig, sondern nur ein Teil dessen, wie es ja auch für alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine der Fall war. Ausserdem ist das Peptid in seiner Länge und seiner Affinität zu optimieren [9]. Hilfreich kann hierbei die Ligandeffizienz sein, bei der die freie Bindungsenthalpie durch die Anzahl der Nicht-Wasserstoffatome geteilt wird [1].
3. Die Struktur des optimierten Protein-Ligand-Komplexes bietet eine hilfreiche Analyse der Bindung und vielfache Informationen zur Abänderung des Peptids, wie sie sich in dieser Arbeit bspw. in den verwendeten Diprolinbausteinen X und Spir2 niederschlug. Lassen sich keine strukturellen Informationen gewinnen, so kann zwar mit einem reinen Liganden basierten Design fortgefahren werden, jedoch kann dies auch zu einem reinen Blindflug werden.
4. Die wichtigen Aminosäurereste des Peptides sollten bereits bei der Optimierung des Peptides bestimmt worden sein [9]. Diese können nun, unter zu Hilfenahme der Struktur des Komplexes, mit unnatürlichen Aminosäuren ersetzt werden. Mittels geeigneter Verfahren ist dann die freie Enthalpie zu bestimmen und die beste Variation auszuwählen.
5. Wurde die Affinität erhöht, kann nun das Molekulargewicht reduziert werden um die Ligandeneffizienz zu erhöhen.

Dieser Zyklus kann natürlich mit den erfolgreich gefundenen Liganden mehrfach durchlaufen werden.

Solch ein Vorhaben lässt sich nur interdisziplinär unter dem Dach der *chemischen Biologie* durchführen, benötigt also das Zusammenfassen von organischer Chemie, Molecular Modelling, Biophysik, Molekularbiologie und Zellbiologie. In dieser Arbeit sollte auch die Notwendigkeit einer geeigneten und sauberen Behandlung des Messproblems der Bestimmung der Affinitäten, bzw. der Differenzen in der Affinität zwischen Liganden gezeigt werden. Angesichts des Aufwandes an Chemie sollte diese Aufgabe nicht als „trivial“ abgetan werden: Als warnendes Beispiel diene hier die Arbeit von Li et al. [75, 119].

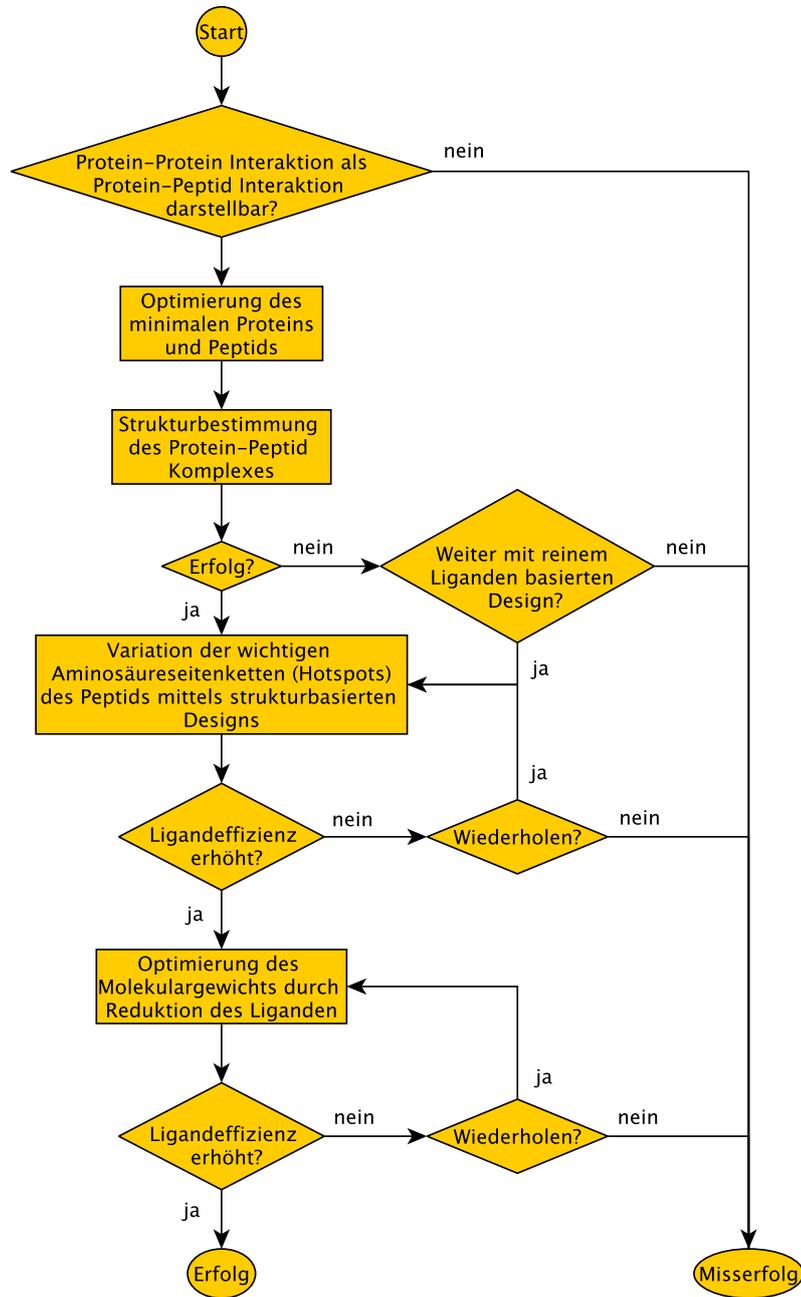


Abbildung 20.1.: Flussdiagramm zur Entwicklung von Liganden zur Inhibition von Protein-Protein-Interaktionen.



Teil VI.  
Tabellen



<i>Allgemeine Formel der untersuchten Liganden</i>	
<i>Abänderung des Liganden</i>	
<i>Messart: ITC oder Fluo</i>	nur für fluoreszenzbasierte Titrationen: CVM oder FT
Anz. DS	Anzahl der Datensätze für Titration; Anzahl der Datensätze für Hintergrund
Reg.-Typ	nur für ITC-Daten: Regressionstyp; siehe Seite 73
$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]	Wert der $K_D$ (Messunsicherheit der $K_D$ )
95 % KI $K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]	untere und obere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls $K_D$
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	Wert der freien Enthalpie $\Delta G^\circ$ (Messunsicherheit der $\Delta G^\circ$ )
95 % KI $\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	untere und obere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls $\Delta G^\circ$
$\Delta H$ [kJ/mol]	nur für ITC-Daten: Wert für Enthalpie $\Delta H$ (Messunsicherheit $\Delta H$ )
$-T \Delta S$ [kJ/mol]	nur für ITC-Daten: Wert für entropische Energie $-T \Delta S$ (Messunsicherheit $-T \Delta S$ )
$M$	optional bei Verwendung des Modells (8.5): Wert des Faktors $M$ (Messunsicherheit $M$ )
$R^2$ oder $R_{\text{linear}}^2$	Wert für den Parameter $R^2$ oder $R_{\text{linear}}^2$ ; siehe Seite 80
$Q; P$	optional bei Vorlage von Replikaten: Qualität des Datenfits; siehe Seite 81

Tabelle 20.1.: Allgemeiner Aufbau der Ergebnistabellen, wie sie nachfolgend verwendet werden.

		Ac-SFE-F-(?)-TEDEL-NH <sub>2</sub>				
		PPPP	XPP	PXP	PPX	XX
Fluo		CVM	CVM	CVM	CVM	CVM
Anz. DS		6	3	3	3	4
K <sub>D</sub> [μM]		19 (2)	40 (4)	25 (2)	5,7 (0,3)	19 (6)
95% KI K <sub>D</sub> [μM]		15 bis 25	31 bis 50	22 bis 30	5,0 bis 6,4	9 bis 37
ΔG° [kJ/mol]		-26,9 (0,3)	-25,1 (0,2)	-26,2 (0,2)	-29,9 (0,1)	-26,9 (0,8)
95% KI ΔG° [kJ/mol]		-27,5 bis -26,2	-25,7 bis -24,5	-26,6 bis -25,8	-30,2 bis -29,6	-28,9 bis -25,2
R <sup>2</sup>		0,999	0,999	1,000	1,000	0,995
Q: P		1,000; 0,983	0,993; 0,820	0,994; 0,868	1,000; 0,999	0,018; 0,074
ITC						
Anz. DS		2; 1	2; 2	1	2; 1	2
Reg.-Typ		011	011	-	011	011
K <sub>D</sub> [μM]		23 (1)	34 (2)	21 (1)	8,4 (0,5)	12,0 (0,9)
95% KI K <sub>D</sub> [μM]		20 bis 25	30 bis 39	18 bis 24	7,6 bis 9,5	10,4 bis 13,9
ΔG° [kJ/mol]		-26,5 (0,2)	-25,5 (0,2)	-26,7 (0,2)	-29,0 (0,1)	-28,1 (0,2)
95% KI ΔG° [kJ/mol]		-26,8 bis -26,2	-25,8 bis -25,2	-27,0 bis -26,4	-29,2, bis -28,7	-28,5 bis -27,7
ΔH <sub>mittel</sub> [kJ/mol]		-14 (3)	-15 (3)	-16,7 (0,4)	-23 (4)	-15 (3)
-T ΔS <sub>mittel</sub> [kJ/mol]		-13 (3)	-11 (3)	-10,0 (0,5)	-6 (4)	-13 (3)
M		0,74 (0,01)	0,83 (0,02)	0,66 (0,01)	0,99 (0,01)	0,81 (0,02)
		0,84 (0,01)	0,72 (0,01)	-	0,81 (0,01)	0,77 (0,01)
R <sup>2</sup> <sub>linear</sub>		0,972; 0,995	0,997; 0,996	0,997	0,993; 0,982	0,991; 0,984

Tabelle 20.2.: Ergebnisse für die Bindung des ActA-Peptids und der davon abgeleiteten Chinären an VASP-EVH1. X ist der Diprolinbaustein und ersetzt je zwei Proline (siehe auch Abb. 1.1). Ersetzte der X-Baustein die letzten beiden Proline, so erhielten wir einen Affinitätsgewinn.

	$\Delta\Delta G$ [kJ/mol]		
	95 % KI [kJ/mol]		
	CVM	ITC	CVM vs. ITC
Ref.peptid vs. XPP	+1,8 (0,4)	+1,0 (0,3)	–
	+1,0 bis +2,6	+0,9 bis +1,7	–
Ref.peptid vs. PXP	0,7 (0,3)	+0,1 (0,2)	–
	0,0 bis +1,4	–0,3 bis +0,5	–
Ref.peptid vs. PPX	–3,0 (0,3)	–2,5 (0,2)	–
	–3,7 bis –2,3	–2,6 bis –1,8	–
Ref.peptid vs. XX	0,0 (0,8)	–1,6 (0,3)	–
	–2,0 bis +2,0	–1,8 bis –0,8	–
PPX vs. PPX	–	–	–0,9 (0,2)
	–	–	–1,3 bis –0,5
XX vs. XX	–	–	+1,2 (0,8)
	–	–	–0,8 bis +3,2

Tabelle 20.3.: Die Differenzen in der freien molaren Enthalpie  $\Delta\Delta G$  für die Peptidchimären zum ActA-Peptid und die Differenz in der freien Enthalpie für die PPX-Chimäre zwischen den beiden Messmethoden CVM und ITC für die Ergebnisse aus Tab. 20.2. Ersetzten wir die letzten beiden Proline mit dem X-Baustein, so erhielten wir eine deutliche Zunahme in der freien Enthalpie.

$\Delta\Delta G^\circ$	$\sigma_{P_t^\circ}/P_t^\circ$	$\sigma_{L_t^\circ}/L_t^\circ$	$ \hat{t}  > t_{\text{krit.}}$		
			CVM	ITC	CVM vs. ITC
PPPP vs. PPX	20 %	10 %	99,7 %	100,0 %	–
	20 %	20 %	95,1 %	99,9 %	–
PPPP vs. XPP	10 %	10 %	98,2 %	98,9 %	–
	10 %	20 %	86,2 %	98,9 %	–
	20 %	10 %	97,4 %	87,1 %	–
	20 %	20 %	86,0 %	87,2 %	–
PPPP vs. XX	20 %	10 %	0,14 %	97,6 %	–
	20 %	20 %	7,5 %	97,8 %	–
PPX vs. PPX	10 %	10 %	–	–	82,1 %
	10 %	20 %	–	–	73,8 %
	20 %	10 %	–	–	75,4 %
	20 %	20 %	–	–	73,2 %

Tabelle 20.4.: Ergebnisse der Monte-Carlo Simulation über den Einfluss der angenommenen Messunsicherheiten für die Protein- und die Ligandkonzentration  $\sigma_{P_t^\circ}$  bzw.  $\sigma_{L_t^\circ}$  auf die Differenz der freien molaren Reaktionsenthalpie  $\Delta\Delta G$  der Peptidchären zum Referenzpeptid aus Tab. 20.3. Der Wert für  $|\hat{t}| > t_{\text{krit.}}$  sollte mindestens 95 % betragen, soll die beobachtete Differenz  $\Delta\Delta G$  signifikant bleiben. Ersetzten wir die letzten beiden Proline mit dem X-Baustein, so blieb die beobachtete Differenz  $\Delta\Delta G$  auch bei einem Fehler von 20 % für die Protein- und Ligandkonzentration signifikant.

	Ac-SFE-F-(?)-TEDEL-NH <sub>2</sub>	
	PPPP	PPX
Fluo	CVM	CVM
Anz. DS	6	3
$K_D$ [ $\mu$ M]	26 (8)	4,4 (0,6)
95 % KI $K_D$ [ $\mu$ M]	12 bis 58	3,0 bis 6,4
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-26,1 (0,8)	-30,6 (0,3)
95 % KI $\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-28,1 bis -24,2	-31,5 bis -29,7
$n$	1,2 (0,2)	1,1 (0,1)
95 % KI $n$	0,7 bis 1,7	0,9 bis 1,4

Tabelle 20.5.: Simultane Bestimmung der  $K_D$ ,  $\Delta G^\circ$  und des stöchiometrischen Faktors  $n$  mittels der impliziten CVM unter Verwendung von (9.17). Beide Liganden banden mit einer eins-zu-eins Stöchiometrie, gleichzeitig blieb die beobachtete Zunahme in der Affinität für die PPX-Chimiäre gegenüber dem ActA-Peptid erhalten.

Ac-SFE-(2Cl-Phe)-(?)-X-TEDEL-NH <sub>2</sub>			
	PP	X	Spir2
Fluo	FT		FT
Anz. DS	5	–	4
$K_D$ [μM]	0,33 (0,06)	–	0,28 (0,08)
95 % KI $K_D$ [μM]	0,23 bis 0,46	–	0,15 bis 0,51
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	–37,0 (0,4)	–	–37,4 (0,8)
95 % KI $\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	–37,9 bis –36,2	–	–38,9 bis –35,9
$M$	0,63 (0,01)	–	0,74 (0,03)
$R_{\text{linear}}^2$	0,965	–	0,891
$Q; P$	0,996; 0,937	–	1,000; 1,000
ITC			
Anz. DS	2; 1	1	1
Reg.-Typ	011	–	–
$K_D$ [μM]	0,77 (0,03)	0,86 (0,03)	0,37 (0,05)
95 % KI $K_D$ [μM]	0,70 bis 0,84	0,79 bis 0,93	0,27 bis 0,49
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	–34,9 (0,1)	–34,6 (0,1)	–36,7 (0,3)
95 % KI $\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	–35,1 bis –34,7	–34,8 bis –34,4	–37,5 bis –36,0
$\Delta H$ [kJ/mol]	–29 (4)	–23,3 (0,2)	–26,5 (0,5)
$-T \Delta S$ [kJ/mol]	–5 (4)	–11,3 (0,2)	–10,3 (0,8)
$M$	0,87 (0,004)	0,73 (0,002)	1,09 (0,01)
	0,79 (0,003)	–	–
$R_{\text{linear}}^2$	0,989; 0,994	0,997	0,988

Tabelle 20.6.: Ergebnisse für die Ersetzungen aller Proline mit dem Diprolinbaustein X und Spir2 für VASP-EVH1. Der X- und der Spir2-Baustein ersetzen jeweils zwei Proline (siehe Abb. 1.1). Es konnten alle Proline des ActA-Peptid durch unsere Diprolinbausteine ersetzt werden, gleichzeitig erhielten wir nanomolar bindende Liganden. Dabei erhöhte die Ersetzung des bindungsentscheidenden Phe durch 2Cl-Phe die Affinität (siehe Tab. 20.8).

	$\Delta\Delta G$ [kJ/mol]	
	95 % KI [kJ/mol]	
	FT	ITC
PPX vs. (Spir2)X	-0,4 (0,8) -2,1 bis +1,3	-1,8 (0,3) -2,5 bis -1,1
PPX vs. XX	- -	+0,3 (0,1) 0,0 bis +0,6
XX vs. (Spir2)X	- -	-2,1 (0,3) -2,8 bis -1,4

Tabelle 20.7.: Der Unterschied in der freien Enthalpie  $\Delta\Delta G$  für die Spir2- und X-enthaltenen Liganden aus Tab. 20.6. Für die ITC-Daten schienen wir für die (Spir2)X-Chimäre einen Gewinn an freier Enthalpie gegenüber der PPX- und der XX-Chimäre zu erhalten.

		Ac-SFE-(?)-PPPP-TEDEL-NH <sub>2</sub>					
		Phe	Trp	2Cl-Phe	1-Nal	2-Nal	L-Cha
Fluo	CVM	CVM	CVM	FT			FT
Anz. DS	6	5	4:1	4:1	–	–	4:1
<i>K<sub>D</sub></i> [µM]	19 (2)	4,0 (0,8)	1,5 (0,3)	–	–	–	52 (2)
95% KI [µM]	15 bis 25	2,3 bis 6,7	1,0 bis 2,3	–	–	–	48 bis 57
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-26,9 (0,3)	-30,8 (0,5)	-33,5 (0,5)	–	–	–	-24,4 (0,1)
95% KI [kJ/mol]	-27,5 bis -26,2	-32,2 bis -29,5	-34,2 bis -32,2	–	–	–	-24,7 bis -24,2
<i>M</i>	–	–	0,68 (0,03)	–	–	–	–
<i>R</i> <sup>2</sup> bzw. <i>R</i> <sub>linear</sub> <sup>2</sup>	0,999	0,985	0,949	–	–	–	0,873
<i>Q</i> ; <i>P</i>	1,000; 0,983	1,000; 0,972	0,999; 0,980	–	–	–	1,000; 0,990
ITC							
Anz. DS	2; 1	2; 1	1	1; 1	1	1	1
Reg.-Typ	011	000	–	–	–	–	–
<i>K<sub>D</sub></i> [µM]	23 (1)	4,0 (0,3)	1,6 (0,1)	5,7 (0,5)	50 (20)	50 (60)	–
95% KI [µM]	20 bis 25	3,4 bis 4,8	1,41 bis 1,75	4,9 bis 6,8	20 bis 130	–	–
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-26,5 (0,2)	-30,8 (0,2)	-33,1 (0,1)	-29,9 (0,2)	-24 (1)	-24 (3)	–
95% KI [kJ/mol]	-26,8 bis -26,2	-31,2 bis -30,4	-33,4 bis -32,9	-30,3 bis -29,5	-26 bis -22	–	–
$\Delta H$ [kJ/mol]	-14 (4)	-18,5 (0,3)	-19,0 (0,4)	-15,1 (0,4)	-15 (5)	-30 (20)	–
$-T\Delta S$ [kJ/mol]	-13 (4)	-12,4 (0,4)	-11,8 (0,6)	-14,8 (0,6)	-9 (6)	0 (30)	–
<i>M</i>	0,74 (0,01); 0,84 (0,01)	0,76 (0,01)	0,74 (0,01)	0,70 (0,01)	–	–	–
<i>R</i> <sub>linear</sub> <sup>2</sup>	0,972; 0,995	0,960	0,993	0,966	0,727	0,456	–
<i>P</i>	–	0,379	–	–	–	–	–

Tabelle 20.8.: Ergebnisse für die Bindung der ActA-Varianten am VASP-EVH1, bei denen das bindungsentscheidende Phenylalanin mit verschiedenen natürlichen und unnatürlichen Aminosäuren ersetzt wurde. Von allen untersuchten Aminosäuren schien 2Cl-Phe den höchsten Gewinn an freier Enthalpie gegenüber dem ActA-Peptid zu erzeugen.

	$\Delta\Delta G$ [kJ/mol]	
	95 % KI [kJ/mol]	
	CVM	ITC
ActA-Peptid vs. Trp	-3,9 (0,6) -5,2 bis -2,5	-4,3 (0,3) -4,8 bis -3,8
ActA-Peptid vs. 2Cl-Phe	-6,4 (0,6) -7,5 bis -5,2	-6,6 (0,2) -7,0 bis -6,2
ActA-Peptid vs. 1-Nal	- -	-3,4 (0,3) -3,9 bis -2,9
ActA-Peptid vs. L-Cha	+2,5 (0,7) +1,8 bis +3,2	- -

Tabelle 20.9.: Die Differenzen in freien molaren Reaktionsenthalpie  $\Delta\Delta G$  für die Ersetzungen des bindungsentscheidenden Phenylalanins des ActA-Peptids aus Tab. 20.8. Hier fällt besonders der 2Cl-Phe-Ligand auf, der von allen Ersetzungen die Affinität am stärksten erhöhte.

$\Delta\Delta G^\circ$	$\sigma_{P_t^\circ}/P_t^\circ$	$\sigma_{L_t^\circ}/L_t^\circ$	$ \hat{t}  > t_{\text{krit.}}$	
			CVM bzw. FT	ITC
Phe vs. 2Cl-Phe	20 %	10 %	100,0 %	100,0 %
	20 %	20 %	99,8 %	100,0 %
Phe vs. Trp	10 %	10 %	100,0 %	97,4 %
	10 %	20 %	97,2 %	86,2 %
	20 %	10 %	99,9 %	91,1 %
	20 %	20 %	96,3 %	83,1 %
Phe vs. 1-Nal	20 %	10 %	–	100,0 %
	20 %	20 %	–	100,0 %
2Cl-Phe vs. Trp	10 %	10 %	82,3 %	93,4 %
	10 %	20 %	70,5 %	90,8 %
	20 %	10 %	75,2 %	75,3 %
	20 %	20 %	68,5 %	72,0 %
2Cl-Phe vs. 1-Nal	20 %	10 %	–	100,0 %
	20 %	20 %	–	99,9 %

Tabelle 20.10.: Ergebnisse der Monte-Carlo Simulation über den Einfluss der angenommenen Messunsicherheiten für die Protein- und die Ligandkonzentration auf die Differenz in der freien Enthalpie  $\Delta\Delta G$  der Peptidchäiren zum jeweiligen Referenzpeptid aus Tab. 20.9. Der Affinitätsgewinn der Ersetzung des Phe mit 2Cl-Phe war auch noch für einen Fehler von 20 % für Protein- und Ligandkonzentration signifikant.

Fluo	(Phe)-PPX		Ac-SFE-(?)-TEDEL-NH <sub>2</sub>		(2Cl-Phe)-XX
	CVM	(Trp)-PPX	CVM	(2Cl-Phe)-PPX	
Anz. DS	3		3	FT 5	-
$K_D$ [ $\mu$ M]	5,7 (0,3)		0,5 (0,2)	0,33 (0,06)	-
95 % KI $K_D$ [ $\mu$ M]	5,0 bis 6,4		0,2 bis 1,2	0,23 bis 0,46	-
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-29,9 (0,1)		-35,7 (0,9)	-37,0 (0,4)	-
95 % KI $\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-30,2 bis -29,6		-38,3 bis -33,8	-37,9 bis -36,2	-
$M$	-		-	0,63 (0,01)	-
$R^2$ bzw. $R_{\text{linear}}^2$	1,000		0,990	0,965	-
$Q; P$	1,000; 0,999		0,966; -	0,993; 0,937	-
ITC					
Anz. DS	2; 1		2; 1	2; 1	1
Reg.-Typ	011		011	011	-
$K_D$ [ $\mu$ M]	8,4 (0,5)		1,9 (0,1)	0,77 (0,03)	0,86 (0,03)
95 % KI $K_D$ [ $\mu$ M]	7,6 bis 9,5		1,7 bis 2,2	0,70 bis 0,84	0,79 bis 0,93
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-29,0 (0,2)		-32,6 (0,2)	-34,9 (0,1)	-34,6 (0,1)
95 % KI $\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-29,2 bis -29,6		-33,0 bis -32,3	-35,1 bis -34,7	-34,8 bis -34,4
$\Delta H$ [kJ/mol]	-23 (4)		-24 (7)	-29 (4)	-23,3 (0,2)
$-T \Delta S$ [kJ/mol]	-6 (4)		-8 (7)	-5 (4)	-11,3 (0,2)
$M$	0,99 (0,01); 0,81 (0,01)		0,89 (0,01); 0,98 (0,01)	0,87 (0,01); 0,79 (0,01)	0,73 (0,01)
$R_{\text{linear}}^2$	0,993; 0,982		0,931; 0,996	0,989; 0,994	0,997

Tabelle 20.11.: Ergebnisse für die Bindung der ActA-Varianten an VASP-EVH1, bei denen das bindungsentscheidende Phe durch natürliche und unnatürliche Aminosäuren und zusätzlich die letzten beiden Proline mit dem X-Baustein ersetzt wurde. Wir erhielten für die (2Cl-Phe)PPX-Chimäre eine nanomolare Bindung.

	$\Delta\Delta G$ [kJ/mol]		
	95 % KI [kJ/mol]		
	CVM bzw. FT	ITC	FT vs. ITC
FPPX vs. WPPX	-5,8 (0,9)	-3,6 (0,2)	-
	-8,0 bis -3,6	-4,0 bis -3,1	-
FPPX vs. (2Cl-Phe)PPX	-7,1 (0,4)	-5,9 (0,2)	-
	-8,0 bis -6,2	-6,2 bis -5,5	-
FPPX vs. (2Cl-Phe)XX	-	-5,6 (0,2)	-
	-	-5,9 bis -5,3	-
(2Cl-Phe)PPX vs. (2Cl-Phe)XX	-	-	-2,1 (0,4)
	-	-	-3,0 bis -1,2

Tabelle 20.12.: Die Differenz in der freien Enthalpie  $\Delta\Delta G$  der Liganden aus Tab. 20.11. Sowohl für den (2Cl)PPX- als auch den (2Cl)XX-Ligand schien der Gewinn an freier Enthalpie am größten zu sein. Gleichzeitig schienen wir für den (2Cl)PPX-Liganden eine starke Differenz in der mittels FT und ITC bestimmten  $\Delta G^\circ$ -Werte zu erhalten.

$\Delta\Delta G^\circ$	$\sigma_{P_t^\circ}/P_t^\circ$	$\sigma_{L_t^\circ}/L_t^\circ$	$ \hat{f}  > t_{\text{krit.}}$		
			CVM bzw. FT	ITC	FT vs. ITC
FPPX vs. (2Cl-Phe)PPX	20 %	10 %	100,0 %	100,0 %	–
	20 %	20 %	98,6 %	100,0 %	–
FPPX vs. WPPX	10 %	10 %	95,5 %	100,0 %	–
	10 %	20 %	78,9 %	100,0 %	–
	20 %	10 %	84,7 %	100,0 %	–
	20 %	20 %	70,8 %	100,0 %	–
FPPX vs. (2Cl-Phe)XX	20 %	10 %	–	100,0 %	–
	20 %	20 %	–	100,0 %	–
WPPX vs. (2Cl-Phe)PPX	20 %	10 %	35,8 %	99,7 %	–
	20 %	20 %	39,2 %	99,8 %	–
(2Cl-Phe)PPX vs. (2Cl-Phe)PPX	20 %	10 %	–	–	97,6 %
	20 %	20 %	–	–	97,5 %

Tabelle 20.13.: Ergebnisse der Monte-Carlo Simulation über den Einfluss der angenommenen Messunsicherheiten für die Protein- und die Ligandkonzentration auf die Differenz  $\Delta G^\circ$  der freien Enthalpie aus Tab. 20.12. Auch bei einer Annahme von einem Fehler von 20 % blieb die beobachtete Affinitätssteigerung des (2Cl-Phe)PPX- und (2Cl-Phe)XX-Liganden gegenüber dem FPPX-Liganden bestehen. Auch die Differenz der freien Enthalpie aus FT und ITC für den (2Cl-Phe)PPX-Liganden blieb für die maximal angenommenen Fehler bestehen.

Ac-SFE-(2Cl-Phe)-PPX-TEDEL-NH <sub>2</sub>			
	VASP-EVH1	Enah-EVH1	EVL-EVH1
Fluo	FT	FT	FT
Anz. DS	5	5; 2	4
$K_D$ [ $\mu$ M]	0,33 (0,06)	0,21 (0,05)	0,23 (0,07)
95 % KI $K_D$ [ $\mu$ M]	0,23 bis 0,46	0,13 bis 0,32	0,12 bis 0,39
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-37,0 (0,4)	-38,1 (0,5)	-37,9 (0,7)
95 % KI $\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-37,9 bis -36,2	-39,3 bis -37,1	-39,4 bis -36,6
$M$	0,63 (0,01)	0,66 (0,01)	0,94 (0,02)
$R_{\text{linear}}^2$	0,965	0,958	0,930
$Q; P$	0,996; 0,937	1,000; 0,977	0,996; 0,999
ITC			
Anz. DS	2; 1	1	1
Reg.-Typ	011	-	-
$K_D$ [ $\mu$ M]	0,77 (0,03)	0,51 (0,06)	0,56 (0,04)
95 % KI $K_D$ [ $\mu$ M]	0,70 bis 0,84	0,39 bis 0,65	0,49 bis 0,64
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-34,9 (0,1)	-35,9 (0,3)	-35,7 (0,2)
95 % KI $\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-35,1 bis -34,7	-36,6 bis -35,3	-36,0 bis -35,4
$\Delta H$ [kJ/mol]	-29 (4)	-25,7 (0,4)	-22,1 (0,2)
$-T \Delta S$ [kJ/mol]	-6 (4)	-10,3 (0,7)	-13,6 (0,3)
$M$	0,87 (0,01); 0,79 (0,01)	0,99 (0,01)	1,07 (0,01)
$R_{\text{linear}}^2$	0,989; 0,994	0,980	0,994

Tabelle 20.14.: Ergebnisse für die Bindung unseres besten Liganden an VASP-, Enah- und EVL-EVH1. Es zeigte sich, dass der Ligand promisk war und mit etwa gleicher Affinität und einer  $K_D$  im hohen nanomolaren Bereich an die drei Domänen band.

(?)-F-PPPP-TEDEL-NH <sub>2</sub>						
Ac-SFE			SFE		Ac	
Fluo	CVM	CVM	CVM	CVM	CVM	CVM
Anz. DS	6	3	5	5	5	5
$K_D$ [ $\mu$ M]	19 (2)	28 (3)	71 (7)	210 (60)		
95 % KI $K_D$ [ $\mu$ M]	15 bis 25	21 bis 38	56 bis 91	120 bis 410		
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-26,9 (0,3)	-26,0 (0,3)	-23,7 (0,3)	-20,9 (0,7)		
95 % KI $\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-27,5 bis -26,2	-26,6 bis -25,3	-24,2 bis -23,1	-22,4 bis -19,3		
$R^2$	0,999	0,999	0,998	0,992		
$Q; P$	1,000; 0,983	0,986; 0,846	0,948; 0,098	0,741; 0,088		
ITC						
Anz. DS	2	-	2	-	-	-
Reg.-Typ	011	-	000	-	-	-
$K_D$ [ $\mu$ M]	23 (1)	-	48 (4)	-	-	-
95 % KI $K_D$ [ $\mu$ M]	20 bis 25	-	38 bis 80	-	-	-
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-26,5 (0,2)	-	-24,6 (0,2)	-	-	-
95 % KI $\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-26,8 bis -26,2	-	-25,1 bis -24,1	-	-	-
$\Delta H$ [kJ/mol]	-14 (3)	-	-15,3 (0,5)	-	-	-
$-T \Delta S$ [kJ/mol]	-13 (3)	-	-9,3 (0,7)	-	-	-
$M$	0,74 (0,01); 0,84 (0,01)	-	0,73 (0,02)	-	-	-
$R_{\text{linear}}^2$	0,972; 0,995	-	0,995	-	-	-
$P$	-	-	0,085	-	-	-

Tabelle 20.15.: Ergebnisse für die Bindung der N-terminal verkürzten ActA-Peptide an VASP-EVH1. Für die Bindung des ActA-Peptids war die Ladung des N-Terminus unwichtig. Wurde jedoch das Peptid bis an das bindungsentcheidende Phenylalanin verkürzt, hatte die Ladung einen Einfluss.

	$\Delta\Delta G$ [kJ/mol]	
	95 % KI [kJ/mol]	
	CVM	ITC
ActA-Peptid vs. SFE	+0,9 (0,4) 0,0 bei +1,8	– –
ActA-Peptid vs. Ac-F	+3,2 (0,4) +2,4 bis +4,0	+1,9 (0,3) +1,3 bis +2,4
ActA-Peptid vs. F	+6,0 (0,7) +4,3 bei +7,7	– –

Tabelle 20.16.: Die Differenz  $\Delta\Delta G$  in der freien molaren Reaktionsenthalpie für die N-terminalen Verkürzungen des ActA-Peptids aus Tab. 20.15. Fehlten sowohl die drei N-terminalen Aminoäuren SFE, als auch die Acetylierung, so verringerte sich die Affinität des Peptids sehr stark.

$\Delta\Delta G^\circ$	$\sigma_{P_t^\circ}/P_t^\circ$	$\sigma_{L_t^\circ}/L_t^\circ$	$ \hat{t}  > t_{\text{krit.}}$	
			CVM	ITC
ActA.Peptid vs. Ac-FPPPP	20 %	10 %	100,0 %	96,6 %
	20 %	20 %	99,2 %	96,6 %
Ac-FPPPP vs. FPPPP	10 %	10 %	99,5 %	–
	10 %	20 %	90,0 %	–
	20 %	10 %	99,4 %	–
	20 %	20 %	90,1 %	–

Tabelle 20.17.: Ergebnisse der Monte-Carlo Simulation über den Einfluss der angenommenen Messunsicherheiten für die Protein- und die Ligandkonzentration auf die Unterschiede  $\Delta\Delta G$  in der freien Enthalpie der Peptidchimären zum Referenzpeptid aus Tab. 20.16. Die Signifikanz für die Verschlechterung der Affinität bei Verlust der Acetylierung des um die ersten drei Aminosäuren SFE verkürzten ActA-Peptids war nur dann signifikant, wenn der Fehler für die Ligandkonzentration kleiner als 20 % war.

		(?)-F-PPPP-TEDEL-NH <sub>2</sub>				
		Ac-SFE	Ac	Dansyl-FE	Dansyl-E	Dansyl
Fluo		CVM	CVM	FT	FT	FT
Anz. DS		6	5	1; 1	1; 1	1; 1
K <sub>D</sub> [μM]		19 (2)	71 (7)	23,0 (0,5)	24,8 (0,4)	29 (1)
95 % KI K <sub>D</sub> [μM]		15 bis 25	56 bis 91	22,7 bis 23,5	24,0 bis 25,4	26 bis 33
ΔG° [kJ/mol]		-26,9 (0,3)	-23,7 (0,3)	-26,5 (0,05)	-26,4 (0,04)	-25,9 (0,1)
95 % KI ΔG° [kJ/mol]		-27,5 bis -26,2	-24,2 bis -23,1	-26,5 bis -26,5	-26,4 bis -26,2	-26,2 bis -25,6
R <sup>2</sup> bzw. R <sup>2</sup> <sub>linear</sub>		0,999	0,998	0,999	0,998	0,965
Q; P		1,000; 0,983	0,948; 0,098	-	-	-
ITC						
Anz. DS		2; 1	2	-	-	1
Reg.-Typ		011	000	-	-	-
K <sub>D</sub> [μM]		23 (1)	48 (4)	-	-	28 (1)
95 % KI K <sub>D</sub> [μM]		20 bis 25	38 bis 80	-	-	26 bis 30
ΔG° [kJ/mol]		-26,5 (0,2)	-24,6 (0,2)	-	-	-26,0 (0,1)
95 % KI ΔG° [kJ/mol]		-26,8 bis -26,2	-25,1 bis -24,1	-	-	-26,2 bis -25,8
ΔH [kJ/mol]		-14 (3)	-15,3 (0,5)	-	-	-12,7 (0,1)
-T ΔS [kJ/mol]		-13 (3)	-9,3 (0,7)	-	-	-13,3 (0,2)
M		0,74 (0,01)	0,73 (0,02)	-	-	0,99 (0,01)
		0,84 (0,01)	-	-	-	-
R <sup>2</sup> <sub>linear</sub>		0,972; 0,995	0,995	-	-	0,999
P		-	0,085	-	-	-

Table 20.18.: Ergebnisse für die Bindung der dansylierten und verschiedenen verkürzten ActA-Peptide an VASP-EVH1. Die Einführung des Dansylrestes schien sich generell günstig auf die Bindung auszuwirken.

	$\Delta\Delta G$ [kJ/mol]	
	95 % KI [kJ/mol]	
	CVM bzw. FT	ITC
ActA-Peptid vs. Dansyl-FPPPP	+1,0 (0,3) +0,3 bei +1,7	+0,5 (0,2) +0,1 bis +0,8
Ac-FPPPP vs. Dansyl-FPPPP	-2,2 (0,3) -2,8 bei -1,5	-1,4 (0,2) -1,9 bis -0,9

Tabelle 20.19.: Die Differenz  $\Delta\Delta G$  für das um die drei N-terminalen Aminosäuren SFE verkürzten und dansylierte Peptids aus Tab. 20.18 im Vergleich zum ActA-Peptid und dem um SFE verkürzten und acetylierten ActA-Peptid. Im Vergleich zum ActA-Peptid verloren wir geringfügig an Affinität, jedoch gewannen wir gegenüber dem verkürzten ActA-Peptid.

	(?)-F-PPPP-TEDEL-NH <sub>2</sub>				
	Ac	1-NS	2-NS	BS	Fmoc
ITC					
Anz. DS	2	1	1	1; 1	1; 1
Reg.-Typ	000	–	–	–	–
<i>K<sub>D</sub></i> [μM]	48 (4)	23 (4)	18 (3)	25 (4)	9 (2)
95% KI <i>K<sub>D</sub></i> [μM]	38 bis 80	17 bis 33	14 bis 26	17 bis 38	7 bis 13
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-24,6 (0,2)	-26,5 (0,4)	-27,0 (0,4)	-26,3 (0,4)	-28,7 (0,4)
95% KI $\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-25,1 bis -24,1	-27,2 bis -25,6	-27,8 bis -26,2	-27,2 bis -25,2	-29,5 bis -27,9
$\Delta H$ [kJ/mol]	-15,3 (0,5)	-15,6 (0,7)	-11,1 (0,6)	-13,9 (0,7)	-16 (1)
$-T \Delta S$ [kJ/mol]	-9,3 (0,7)	-11 (1)	-16 (1)	-12 (1)	-12 (1)
<i>M</i>	0,73 (0,02)	0,97 (0,03)	0,78 (0,02)	1,23 (0,05)	0,79 (0,02)
$R^2_{\text{linear}}$	0,995	0,990	0,975	0,987	0,948
<i>P</i>	0,085	–	–	–	–

Tabella 20.20.: Ergebnisse für die Bindung der um die N-terminalen drei Aminosäuren SFPE verkürzten und N-terminal mit Dansylderivaten und Fmoc umgesetzten ActA-Peptide an VASP-EVH1. Wir schienen sowohl für die Dansylderivate, aber besonders für Fmoc, eine Erhöhung in der Affinität zu erhalten.

	(?)–(2Cl-Phe)–PPPP–TEDEL–NH <sub>2</sub>		
	Ac–SFE	Ac	BS
Fluo	FT	FT	FT
Anz. DS	4; 1	3; 1	4; 3
$K_D$ [ $\mu$ M]	1,5 (0,3)	5,2 (0,3)	5,1 (0,5)
95 % KI $K_D$ [ $\mu$ M]	1,0 bis 2,3	4,7 bis 5,8	4,1 bis 6,1
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	–33,5 (0,5)	–30,2 (0,1)	–30,2 (0,2)
95 % KI $\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	–34,2 bis –32,2	–30,4 bis –29,9	–30,7 bis –29,7
$M$	0,68 (0,03)	–	–
$R_{\text{linear}}^2$	0,949	0,882	0,781
$Q; P$	0,999; 0,980	0,000; 0,978	0,973; 0,292

Tabelle 20.21.: Ergebnisse für die Bindung der N-terminal um SFE verkürzten ActA-Peptide an VASP-EVH1, bei denen das bindungsentscheidende Phenylalanin mit 2Cl-Phe ersetzt und der N-Terminus einmal acetyliert und einmal mit Benzylsulfonyl umgesetzt wurde. Es zeigte sich erstaunlicherweise kein Unterschied zwischen der Acetylierung und dem Benzylsulfonyl-Restes auf die Bindung.

	Ac ; NH <sub>2</sub>	- ; NH <sub>2</sub>	Ac ; -	- ; -
Fluo	CVM	CVM	CVM	CVM
Anz. DS	6	3	4	3
<i>K<sub>D</sub></i> [μM]	19 (2)	28 (3)	37 (3)	44 (4)
95% KI <i>K<sub>D</sub></i> [μM]	15 bis 25	21 bis 38	31 bis 44	35 bis 55
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-26,9 (0,3)	-26,0 (0,3)	-25,3 (0,2)	-24,9 (0,2)
95% KI $\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-27,5 bis -26,2	-26,6 bis -25,3	-25,8 bis -24,9	-25,4 bis -24,3
<i>R</i> <sup>2</sup>	0,999	0,999	1,000	0,999
<i>Q</i> ; <i>P</i>	1,000; 0,983	0,986; 0,846	0,989; 0,757	0,999; 0,994

Tabelle 20.22.: Ergebnisse für die Bindung der ActA-Peptide mit unterschiedlicher Acetylierung bzw. Amidierung an VASP-EVH1. Die Ladung des C-Terminus des ActA-Peptids hatte einen Einfluss auf die Affinität der Bindung, die Ladung des N-Terminus dagegen nicht.

	$\Delta\Delta G$ [kJ/mol] 95 % KI [kJ/mol]
ActA-Peptid vs. -; NH <sub>2</sub>	+0,9 (0,4) 0,0 bis +1,8
ActA-Peptid vs. Ac; -	+1,6 (0,3) +0,8 bis +2,3
ActA-Peptid vs. -; -	+2,0 (0,3) +1,2 bis +2,8
-; NH <sub>2</sub> vs. -; -	+1,1 (0,4) +0,3 bis +1,9
-; NH <sub>2</sub> vs. Ac; -	+0,7 (0,3) -0,1 bis +1,5
Ac; - vs. -; -	+0,4 (0,3) -0,2 bis +1,0

Tabelle 20.23.: Die Differenz  $\Delta\Delta G$  für den Einfluss der Acetylierung und Amidierung des ActA-Peptids auf die Bindung aus Tab. 20.22. Die Ladung des C-Terminus des ActA-Peptids hatte einen Einfluss auf die Affinität der Bindung. Die Ladung des N-Terminus des ActA-Peptids hatte keinen Einfluß auf die Bindung.

$\Delta\Delta G^\circ$	$\sigma_{P_t^\circ}/P_t^\circ$	$\sigma_{L_t^\circ}/L_t^\circ$	$ \hat{t}  > t_{\text{krit.}}$ CVM
ActA-Peptid vs. Ac ; –	10 %	10 %	95,1 %
	10 %	20 %	82,4 %
	20 %	10 %	93,7 %
	20 %	20 %	82,1 %
ActA-Peptid vs. – ; –	10 %	10 %	99,4 %
	10 %	20 %	91,1 %
	20 %	10 %	99,1 %
	20 %	20 %	90,7 %
– ; NH <sub>2</sub> vs. – ; –	10 %	10 %	71,0 %
	10 %	20 %	65,1 %
	20 %	10 %	69,5 %
	20 %	20 %	64,3 %

Tabelle 20.24.: Ergebnisse der Monte-Carlo Simulation über den Einfluss der angenommenen Messunsicherheiten für die Protein- und die Ligandkonzentration auf die Unterschiede der freien Enthalpie  $\Delta G^\circ$  der Peptidchiären zum Referenzpeptid aus Tab. 20.23.

		Ac-SFE-W-PPPP-(?)-NH <sub>2</sub>					
T		Phe-2Cl	L-C'ha	D-C'ha	1-Nal	2-Nal	Bpa
Fluo	FT	FT	FT	FT	FT	FT	FT
Anz. DS	3; 2	3; 2	3; 2	3; 2	3; 2	3; 2	3; 2
$K_D$ [ $\mu$ M]	118 (8)	107 (4)	84 (11)	100 (3)	136 (9)	131 (9)	52 (5)
95 % KI [ $\mu$ M]	103 bis 136	99 bis 116	67 bis 111	95 bis 107	118 bis 157	114 bis 149	43 bis 62
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-22,4 (0,2)	-22,7 (0,1)	-23,2 (0,3)	-22,8 (0,1)	-22,1 (0,2)	-22,2 (0,2)	-24,4 (0,3)
95 % KI [kJ/mol]	-22,7 bis -22,1	-22,8 bis -22,5	-23,8 bis -22,6	-23,0 bis -22,7	-22,4 bis -21,7	-22,5 bis -21,8	-24,9 bis -24,0
$R_{\text{linear}}^2$	0,790	0,928	0,529	0,944	0,795	0,780	0,749
$Q; P$	1,000; 1,000	0,184; 0,655	1,000; 1,000	0,124; 0,813	0,966; 0,801	1,000; 0,999	0,998; 0,960
ITC							
Anz. DS	1; 1	1; 1	2; 1	1; 1	3; 1	3; 1	1; 1
Reg.-Typ	-	-	011	-	000	011	-
$K_D$ [ $\mu$ M]	43 (5)	29 (3)	50 (30)	77 (12)	36 (11)	31 (4)	35 (5)
95 % KI [ $\mu$ M]	34 bis 54	24 bis 37	20 bis 170	57 bis 112	21 bis 81	23 bis 43	26 bis 49
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-24,9 (0,3)	-25,9 (0,3)	-25 (2)	-23,5 (0,4)	-25,4 (0,8)	-25,8 (0,4)	-25,5 (0,4)
95 % KI [kJ/mol]	-25,5 bis -24,3	-26,4 bis -25,3	-27 bis -21,5	-24,2 bis -22,5	-26,8 bis -23,4	-26,5 bis -24,9	-26,2 bis -24,6
$\Delta H$ [kJ/mol]	-8,6 (0,2)	-7,6 (0,2)	-7 (2)	-8,4 (0,3)	-7,4 (0,8)	-11, (1)	-25 (1)
$-T \Delta S$ [kJ/mol]	-16,3 (0,5)	-19,2 (0,5)	-18 (2)	-15,1 (0,7)	-18 (2)	-15 (1)	0 (1,4)
$M$	0,78 (0,03)	0,83 (0,02)	1,1 (0,1)	1,21 (0,08)	0,82 (0,04)	0,79 (0,03)	0,83 (0,03)
$R_{\text{linear}}^2$	0,996	0,994	0,923	0,995	0,920	0,983	0,989
$Q; P$	-	-	0,898	-	0,67 (0,02)	0,960	0,991
					0,017; 0,316	-	-

Tabelle 20.25.: Ergebnisse für die Bindung an VASP-EVH1 der Peptide mit der Ersetzung des C-terminalen flankierenden Epitops durch eine unnatürliche Aminosäure. Aufgrund der cis/trans-Isomerie von Trp-Pro-Paaren war die aus den FT-Daten bestimmte Affinität zu niedrig geschätzt. Aber auch die ITC-Daten zeigten für fast alle Ersetzungen keinen Unterschied in der Affinität.

	Ac; PP-(2Cl-Phe)	(?)-(2Cl-Phe)-PP-(?)-NH <sub>2</sub>	-; PP-(2Cl-Phe)	Ac; X-(2Cl-Phe)	Ac; X
Fluo	FT	FT	FT	FT	FT
Anz. DS	3; 1	4; 1	4; 1	4; 1	5; 5
<i>K<sub>D</sub></i> [μM]	25 (1)	130 (10)	18 (2)	40 (12)	
95 % KI [μM]	23 bis 28	110 bis 150	15 bis 22	23 bis 69	
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-26,2 (0,1)	-22,2 (0,2)	-27,0 (0,3)	-25,2 (0,7)	
95 % KI [kJ/mol]	-26,5 bis -26,0	-22,7 bis -21,8	-27,5 bis -26,5	-26,5 bis -23,8	
$R_{\text{linear}}^2$	0,896	0,718	0,613	0,163	
<i>Q; P</i>	0,000; 0,481	0,999; 0,982	1,000; 1,000	1,000; 0,898	
ITC					
Anz. DS	1	1	3; 1	3; 1	
Reg.-Typ	-	-	000	000	
<i>K<sub>D</sub></i> [μM]	27 (2)	42 (7) *	9 (2)	23 (2)	
95 % KI [μM]	23 bis 32	31 bis 61	6 bis 15	19 bis 27	
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-26,1 (0,2)	-23,6 (0,4) *	-28,7 (0,6)	-26,5 (0,2)	
95 % KI [kJ/mol]	-26,4 bis -25,7	-24,3 bis -22,7	-29,8 bis -27,5	-26,9 bis -26,1	
$\Delta H$ [kJ/mol]	-11,1 (0,2)	+5,1 (0,2) *	-14 (1)	-18 (1)	
$-T \Delta S$ [kJ/mol]	-15,0 (0,4)	-28,7 (0,2) *	-14 (2)	-8 (1)	
<i>M</i>	1,17 (0,02)	0,51 (0,03) *	0,62 (0,06)	0,56 (0,01)	
$R_{\text{linear}}^2$	0,998	0,995	0,532	0,903	
<i>Q; P</i>	-; -	-; -	0,999; 0,994	1,000; 0,971	

Tabelle 20.26.: Ergebnisse für die Bindung der kleinsten Liganden dieser Arbeit an VASP-EVH1. Wir konnten die Chimären bis auf die Länge des Konsensusmotifs verkürzen, und erhielten immer noch eine Affinität, wie für das ActA-Peptid. Gleichzeitig bekamen wir Probleme mit der Löslichkeit der Liganden, weshalb die FT-*K<sub>D</sub>* gegenüber der ITC-*K<sub>D</sub>* zu hoch geschätzt ist. In der ITC konnten wir durch die Verwendung des Faktors *M* die Ligandkonzentration in der Regression als anzupassenden Parameter verwenden.

\* bei 8 °C gemessen

	$\Delta\Delta G$ [kJ/mol]	
	95 % KI [kJ/mol]	
	CVM bzw. FT	ITC
ActA-Peptid vs. Ac; X-(2Cl-Phe)	-0,1 (0,4) -0,9 bei +0,7	-2,2 (0,6) -3,4 bis -1,0
ActA-Peptid vs. Ac; X	+1,7 (0,7) +0,2 bis +3,1	0,0 (0,3) -0,5 bis 0,5
Ac; X-(2Cl-Phe) vs. Ac; X	+1,8 (0,7) +0,4 bis +3,2	+2,2 (0,6) +1,0 bis +3,4

Tabelle 20.27.: Die Änderung in der freien Bindungsenthalpie  $\Delta\Delta G$  für die verkürzten Peptide aus Tab. 20.26 im Vergleich zum ActA-Peptid. Die ITC-Daten zeigen, dass die beiden kurzen Liganden besser oder genauso gut an VASP-EVH1 banden wie das ActA-Peptid. Es zeigt sich, dass der Unterschied  $\Delta\Delta G$  in der FT für den kürzesten Liganden zum ActA-Peptid nur schwach war. Der Verlust des C-terminalen 2Cl-Phe bedeutete für unseren kürzesten Liganden einen Verlust von ca. 2 kJ/mol an Affinität.



Teil VII.

## Literaturverzeichnis



# Literaturverzeichnis

- [1] ABAD-ZAPATERO, C.: Ligand efficiency indices for effective drug discovery. In: *Expert Opinion on Drug Discovery* 2 (2007), Nr. 4, S. 469–488
- [2] ADAM, G. ; LÄUGER, P. ; STARK, G.: *Physikalische Chemie und Biophysik*. 4. Auflage. Springer Verlag, 2003
- [3] ARDÁ, A. ; JIMÉNEZ, C. ; RODRÍGUEZ, J.: A study of polychlorinated leucine derivatives: synthesis of (2S,4S)-5,5-dichloroleucine. In: *Tetrahedron Letters* 45 (2004), Nr. 16, S. 3241–3243
- [4] ASMUS, E.: Kritische Untersuchung über die Grenzen der Anwendbarkeit der Methode der kontinuierlichen Variation nach Job II. Teil. In: *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 183 (1961), S. 401–412
- [5] ASMUS, E.: Kritische Untersuchung über die Grenzen der Anwendbarkeit der Methode der kontinuierlichen Variationen nach Job I. Teil. In: *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 183 (1961), S. 321–333
- [6] BACHMANN, C. ; FISCHER, L. ; WALTER, U. ; REINHARD, M.: The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. In: *The Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), Nr. 33, S. 23549–23557
- [7] BAKER, B. M. ; MURPHY, K. P.: Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry. In: *Biophysical Journal* 71 (1996), Nr. 4, S. 2049–55
- [8] BALL, L. J. ; JARCHAU, T. ; OSCHKINAT, H. ; WALTER, U.: EVH1 domains: structure, function and interactions. In: *FEBS letters* 513 (2002), Nr. 1, S. 45–52
- [9] BALL, L. J. ; KÜHNE, R. ; HOFFMANN, B. ; HÄFNER, A. ; SCHMIEDER, P. ; VOLKMER-ENGERT, R. ; HOF, M. ; WAHL, M. ; SCHNEIDER-MERGENER, J. ; WALTER, U. ; OSCHKINAT, H. ; JARCHAU, T.: Dual epitope recognition by the

- VASP EVH1 domain modulates polyproline ligand specificity and binding affinity. In: *The EMBO Journal* 19 (2000), Nr. 18, S. 4903–4914
- [10] BALL, L. J. ; KÜHNE, R. ; SCHNEIDER-MERGENER, J. ; OSCHKINAT, H.: Recognition of proline-rich Motifs by Protein-Protein-Interaction domains. In: *Angewandte Chemie International Edition in English* 44 (2005), S. 2852–2869
- [11] BANDUR, N. G. ; HARMS, K. ; KOERT, U.: First Stereoselective Synthesis of a Pro-Pro *E*-Alkene Dipptide Isostere. In: *Synlett* 5 (2005), S. 773–776
- [12] BANDUR, N. G. ; HARMS, K. ; KOERT, U.: First Stereoselective Synthesis of a Tyr-Tyr *E*-Alkene Isostere. In: *Synlett* 1 (2007), S. 99–102
- [13] BARANAUSKIENĖ, L. ; PETRIKAITĖ, V. ; MATULIENĖ, J. ; MATULIS, D.: Titration Calorimetry Standards and the Precision of Isothermal Titration Calorimetry Data. In: *International Journal of Molecular Sciences* 10 (2009), Nr. 6, S. 2752–2762
- [14] BARZIK, M. ; K., Tatyana I. ; HIGGS, H. N. ; HAZELWOOD, L. ; HANEIN, D. ; GERTLER, F. B. ; SCHAFER, D. A.: Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (2005), Nr. 31, S. 28653–28662
- [15] BATES, D. M. ; WATTS, D. G.: *Nonlinear Regression Analysis and Its Applications*. John Wiley & Sons, Inc., 1988
- [16] BEAR, J. E. ; GERTLER, F. B.: Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. In: *Journal of Cell Science* 122 (2009), Nr. Pt 12, S. 1947–1953
- [17] BEAR, J. E. ; LOUREIRO, J. J. ; LIBOVA, I. ; FÄSSLER, R. ; WEHLAND, J. ; GERTLER, F. B.: Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. In: *Cell* 101 (2000), Nr. 7, S. 717–728
- [18] BEAR, J. E. ; SVITKINA, T. M. ; KRAUSE, M. ; SCHAFER, D. A. ; LOUREIRO, J. J. ; STRASSER, G. A. ; MALY, I. V. ; CHAGA, O. Y. ; COOPER, J. A. ; BORISY, G. G. ; GERTLER, F. B.: Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. In: *Cell* 109 (2002), Nr. 4, S. 509–521
- [19] BEYERMANN, M. ; FECHNER, K. ; FURKERT, J. ; KRAUSE, E. ; BIENERT, M.: A single-point slight alteration set as a tool for structure-activity relationship studies of ovine corticotropin releasing factor. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 39 (1996), S. 3324–3330

- [20] BIRDSALL, B. ; KING, R. W. ; WHEELER, M. R. ; LEWIS, C. A. ; GOODE, S. R. ; DUNLAP, R. B. ; ROBERTS, G. C.: Correction for light absorption in fluorescence studies of protein-ligand interactions. In: *Analytical Biochemistry* 132 (1983), Nr. 2, S. 353–61
- [21] BOGGS, P. T. ; BYRD, R. H. ; ROGERS, J. E. ; SCHNABEL, R. B.: *User's Reference Guide for ODRPACK Version 2.01 Software for Weighted Orthogonal Distance Regression*, 1992
- [22] BOOS, D. D.: Introduction to the Bootstrap World. In: *Statistical Science* 18 (2003), Nr. 2, S. 168–174
- [23] BORISSEVITCH, I. E.: More about the inner filter effect: corrections of Stern—Volmer fluorescence quenching constants are necessary at very low optical absorption of the quencher. In: *Journal of Luminescence* 81 (1999), S. 219–224
- [24] BUTT, E. ; ABEL, K. ; KRIEGER, M. ; PALM, D. ; HOPPE, V. ; HOPPE, J. ; WALTER, U.: cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. In: *The Journal of Biological Chemistry* 269 (1994), Nr. 20, S. 14509–14517
- [25] CARPENTER, J. ; BITHELL, J.: Bootstrap confidence intervals: when, which, what? A practical guide for medical statisticians. In: *Statistics in Medicine* 19 (2000), S. 1141–1164
- [26] COMBS, A. P. ; KAPOOR, T. M. ; FENG, S. ; CHEN, J. K. ; DAUDÉ-SNOW, L. F. ; SCHREIBER, S. L.: Protein structure-based combinatorial chemistry: discovery of non-peptide binding elements to Src SH3 domain. In: *Journal of the American Chemical Society* 118 (1996), Nr. 1, S. 287–288
- [27] DEMERS, J.-P. ; MITTERMAIER, A.: Binding Mechanism of an SH3 Domain Studied by NMR and ITC. In: *Journal of the American Chemical Society* 131 (2009), Nr. 12, S. 4355–4367
- [28] DOUGHERTY, D. A.: Cation- $\pi$  interactions involving aromatic amino acids. In: *The Journal of Nutrition* 137 (2007), S. 1504S–1508S
- [29] DRAPER, N. R. ; SMITH, H.: *Applied Regression Analysis*. Wiley & Sons, 1966

- [30] DREES, F. ; GERTLER, F. B.: Ena/VASP: proteins at the tip of the nervous system. In: *Current opinion in neurobiology* 18 (2008), Nr. 1, S. 53–59
- [31] DUGAVE, C. ; DEMANGE, L.: Cis–Trans Isomerization of Organic Molecules and Biomolecules: Implications and Applications. In: *Chemical Reviews* 103 (2003), S. 2475–2532
- [32] EFRON, B.: Better Bootstrap Confidence Intervals. In: *Journal of the American Statistical Association* 82 (1987), Nr. 397, S. 171–185
- [33] EFRON, B.: Second Thoughts on the Bootstrap. In: *Statistical Science* 18 (2003), Nr. 2, S. 135–140
- [34] EFTINK, M. R.: Fluorescence Methods for Studying Equilibrium Macromolecule-Ligand Interactions. In: *Methods in Enzymology* 278 (1997), S. 221–257
- [35] ERMEKOVA, K. S. ; ZAMBRANO, N. ; LINN, H. ; MINOPOLI, G. ; GERTLER, F. B. ; RUSSO, T. ; SUDOL, M.: The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of *Drosophila* enabled. In: *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), Nr. 52, S. 32869–32877
- [36] FEDOROV, A. A. ; FEDOROV, E. ; GERTLER, F. B. ; ALMO, S. C.: Structure of EVH1, a novel proline-rich ligand-binding module involved in cytoskeletal dynamics and neural function. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 6 (1999), S. 661–665
- [37] FENG, S. ; KASAHARA, C. ; RICKLES, R. J. ; SCHREIBER, S. L.: Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1995), Nr. 26, S. 12408–12415
- [38] FERRON, F. ; REBOWSKI, G. ; LEE, S. H. ; DOMINGUEZ, R.: Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. In: *The EMBO Journal* 26 (2007), Nr. 21, S. 4597–4606
- [39] FISCHER, G.: Chemical aspects of peptide bond isomerisation. In: *Chemical Society Reviews* 29 (2000), Nr. 2, S. 119–127
- [40] FREUND, C. ; DÖTSCH, V. ; NISHIZAWA, K. ; REINHERZ, E. L. ; WAGNER, G.: The GYF domain is a novel structural fold that is involved in lymphoid signaling through proline-rich sequences. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 6 (1999), Nr. 7, S. 656–660

- [41] FROLOFF, N. ; WINDEMUTH, A. ; HONIG, B.: On the calculation of binding free energies using continuum methods: application to MHC class I protein-peptide interactions. In: *Protein Science* 6 (1997), Nr. 6, S. 1293–301
- [42] FURMAN, C. ; SIEMINSKI, A. L. ; KWIATKOWSKI, A. V. ; RUBINSON, D. A. ; VASILE, E. ; BRONSON, R. T. ; FÄSSLER, R. ; GERTLER, F. B.: Ena/VASP is required for endothelial barrier function in vivo. In: *The Journal of Cell Biology* 179 (2007), Nr. 4, S. 761–775
- [43] GALLIVAN, J. P. ; DOUGHERTY, D. A.: Cation-pi interactions in structural biology. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999), Nr. 17, S. 9459–9464
- [44] GERTLER, F. B. ; NIEBUHR, K. ; REINHARD, M. ; WEHLAND, J. ; SORIANO, P.: Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. In: *Cell* 87 (1996), Nr. 2, S. 227–239
- [45] GERWICK, W. H. ; LESLIE, P. ; LONG, G. C. ; MARQUEZ, B. L. ; WILLIS, C. L.: [6-<sup>13</sup>C]-(2S,4S)-5-Chloroleucine: synthesis and incubation studies with cultures of the cyanobacterium, *Lyngbya majuscula*. In: *Tetrahedron Letters* 44 (2003), S. 285–288
- [46] GOLEMI-KOTRA, D. ; MAHAFFY, R. ; FOOTER, M. J. ; HOLTZMAN, J. H. ; POLLARD, T. D. ; THERIOT, J. A. ; SCHEPARTZ, A.: High affinity, paralog-specific recognition of the Mena EVH1 domain by a miniature protein. In: *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004), Nr. 1, S. 4–5
- [47] GÓMEZ, J. ; FREIRE, E.: Thermodynamic mapping of the inhibitor site of the aspartic protease endothiapepsin. In: *Journal of Molecular Biology* 252 (1995), Nr. 3, S. 337–50
- [48] GRIEBEL, M. ; KNAPEK, S. ; ZUMBUSCH, G. ; CAGLAR, A.: *Numerische Simulation in der Moleküldynamik*. Springer Verlag, 2004
- [49] HAMON, M. ; BIERNE, H. ; COSSART, P.: *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. In: *Nature Reviews Microbiology* 4 (2006), Nr. 6, S. 423–434
- [50] HAN, G. ; FAN, B. ; ZHANG, Y. ; ZHOU, X. ; WANG, Y. ; DONG, H. ; WEI, Y. ; SUN, S. ; HU, M. ; ZHANG, J. ; WEI, L.: Positive regulation of migration and invasion by vasodilator-stimulated phosphoprotein via Rac1 pathway in human breast cancer cells. In: *Oncology Reports* 20 (2008), Nr. 4, S. 929–939

- [51] HARBECK, B. ; HÜTTELMAIER, S. ; SCHLUTER, K. ; JOCKUSCH, B. M. ; ILLENBERGER, S.: Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. In: *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), Nr. 40, S. 30817–30825
- [52] HEINE, H. N.: *Peptidmimetika an Zellulosemembranen – SPOT-Synthese und Screening kombinatorischer Peptoid-Bibliotheken*, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin, Dissertation, 2000
- [53] HINDERAKER, M. P. ; RAINES, R. T.: An electronic effect on protein structure. In: *Protein Science* 12 (2003), Nr. 6, S. 1188–1194
- [54] HOLTZMAN, J. H. ; WORONOWICZ, K. ; GOLEMI-KOTRA, D. ; SCHEPARTZ, A.: Miniature protein ligands for EVH1 domains: interplay between affinity, specificity, and cell motility. In: *Biochemistry* 46 (2007), Nr. 47, S. 13541–13553
- [55] HORNG, J.-C. ; RAINES, R. T.: Stereoelectronic effects on polyproline conformation. In: *Protein Science* 15 (2006), Nr. 1, S. 74–83
- [56] HORSTRUP, K. ; JABLONKA, B. ; HÖNIG-LIEDL, P. ; JUST, M. ; KOCHSIEK, K. ; WALTER, U.: Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. In: *The FEBS Journal* 225 (1994), Nr. 1, S. 21–27
- [57] HU, L.-D. ; ZOU, H.-F. ; ZHAN, S.-X. ; CAO, K.-M.: EVL (Ena/VASP-like) expression is up-regulated in human breast cancer and its relative expression level is correlated with clinical stages. In: *Oncology Reports* 19 (2008), Nr. 4, S. 1015–1020
- [58] HUANG, C. Y.: Determination of Binding Stoichiometry by the Continuous Variation Method: The Job Plot. In: *Methods in Enzymology* 87 (1982), S. 509–525
- [59] HUANG, C. Y. ; ZHOU, R. ; YANG, D. C. H. ; CHOCK, P. B.: Application of the continuous variation method to cooperative interactions: mechanism of Fe(II)-ferrozine chelation and conditions leading to anomalous binding ratios. In: *Biophysical Chemistry* 100 (2003), Nr. 1-3, S. 143–149
- [60] HUNKE, C. ; HIRSCH, T. ; EICHLER, J.: Structure-based synthetic mimicry of discontinuous protein binding sites: inhibitors of the interaction of Mena EVH1 domain with proline-rich ligands. In: *ChemBioChem* 7 (2006), Nr. 8, S. 1258–1264

- [61] HUÏ, P.: *Stereoselektive Synthese von Prolin-Prolin-Dipeptidmimetika*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln, Dissertation, 2010
- [62] INGHAM, K. C.: On the Application of Job's Method of Continuous Variation to the Stoichiometry of Protein-Ligand Complexes. In: *Analytical Biochemistry* 68 (1975), S. 660–663
- [63] JACKSON, M. B.: *Molecular and Cellular Biophysics*. Cambridge University Press, 2006
- [64] JOB, M. P.: Recherches sur la Formation de Complexes Minéraux en Solution, et sur leur Stabilité. In: *Annales de Chimie* 9 (1928), S. 113–203
- [65] KAKINOKI, S. ; HIRANO, Y. ; OKA, M.: On the stability of polyproline-I and II structures of proline oligopeptides. In: *Polymer Bulletin* 53 (2005), Nr. 2, S. 109–115
- [66] KANG, N. ; YAQOUB, U. ; GENG, Z. ; BLOCH, K. ; LIU, C. ; GOMEZ, T. ; BILLADEAU, D. ; SHAH, V.: Focal Adhesion Assembly in Myofibroblasts Fosters a Microenvironment that Promotes Tumor Growth. In: *The American Journal of Pathology* 177 (2010), Nr. 4, S. 1888–1900
- [67] KATAOKA, A. ; KOGA, Y. ; UESUGI, A. ; TOZAKI-SAITOH, H. ; TSUDA, M. ; INOUE, K.: Involvement of vasodilator-stimulated phosphoprotein in UDP-induced microglial actin aggregation via PKC- and Rho-dependent pathways. In: *Purinergic Signalling* 7 (2011), Nr. 4, S. 403–411
- [68] KAUER, J. C. ; ERICKSON-VIITANEN, S. ; WOLFE, H. R. ; DEGRADO, W. F.: p-Benzoyl-L-phenylalanine, a new photoreactive amino acid. Photolabeling of calmodulin with a synthetic calmodulin-binding peptide. In: *The Journal of Biological Chemistry* 261 (1986), Nr. 23, S. 10695–10700
- [69] KLEBE, G.: *Wirkstoffdesign – Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, 2009
- [70] KLUGE, G. ; NEUGEBAUER, G.: *Grundlagen der Thermodynamik*. Kap. Thermodynamische Potentiale, Spektrum Akademischer Verlag, 1994
- [71] KÜHNEL, K. ; JARCHAU, T. ; WOLF, E. ; SCHLICHTING, I. ; WALTER, U. ; WITTINGHOFER, A. ; STRELKOV, S. V.: The VASP tetramerization domain is a right-handed coiled coil based on a 15-residue repeat. In: *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004), Nr. 49, S. 17027–17032
- [72] LAKOWICZ, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. Auflage. Springer Science+Business Media, New York, 2006
- [73] LAMBRECHTS, A. ; KWIATKOWSKI, A. V. ; LANIER, L. M. ; BEAR, J. E. ; VANDEKERCKHOVE, J. ; AMPE, C. ; GERTLER, F. B.: cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains. In: *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), November, Nr. 46, S. 36143–36151
- [74] LANIER, L. M. ; GATES, M. A. ; WITKE, W. ; MENZIES, A. S. ; WEHMAN, A. M. ; MACKLIS, J. D. ; KWIATKOWSKI, D. ; SORIANO, P. ; GERTLER, F. B.: Mena is required for neurulation and commissure formation. In: *Neuron* 22 (1999), Nr. 2, S. 313–325
- [75] LI, H. ; LAWRENCE, D. S.: Acquisition of Fyn-selective SH3 Domains Ligands via a combinatorial Library Strategy. In: *Chemistry & Biology* 12 (2005), S. 905–912
- [76] LOIDL, G. ; MUSIOL, H. J. ; BUDISA, N. ; HUBER, R. ; POIROT, S. ; FOURMY, D. ; MORODER, L.: Synthesis of beta-(1-azulenyl)-L-alanine as a potential blue-colored fluorescent tryptophan analog and its use in peptide synthesis. In: *Journal of Peptide Science* 6 (2000), Nr. 3, S. 139–144
- [77] MACDONALD, B. C. ; LVIN, S. J. ; PATTERSON, H.: Correction of fluorescence inner filter effects and the partitioning of pyrene to dissolved organic carbon. In: *Analytica Chimica Acta* 338 (1997), S. 155–162
- [78] MACHNER, M. P. ; URBANKE, C. ; BARZIK, M. ; OTTEN, S. ; SECHI, A. S. ; WEHLAND, J. ; HEINZ, D. W.: ActA from *Listeria monocytogenes* can interact with up to four Ena/VASP homology 1 domains simultaneously. In: *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), Nr. 43, S. 40096–40103
- [79] MANLY, B. F. J.: *Randomization, Bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology*. 3. Auflage. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, 2007
- [80] MECOZZI, S. ; WEST, A. P. ; DOUGHERTY, D. A.: Cation-pi interactions in aromatics of biological and medicinal interest: electrostatic potential surfaces as a useful qualitative guide. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996), Nr. 20, S. 10566–10571

- [81] METROLOGY, Working Group 1. of the Joint Committee for Guides in: *Evaluation of measurement data – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM 1995 with minor corrections)*. International Organization for Standardization (Veranst.), 2008
- [82] MICROCAL, LLC: *ITC Data Analysis in Origin - Tutorial Guide, Version 7.0*, 2004
- [83] MORKEN, J. P. ; KAPOOR, T. M. ; FENG, S. ; SHIRAI, F. ; SCHREIBER, S. L.: Exploring the Leucine-Proline Binding Pocket of the Src SH3 Domain Using Structure-Based, Split-Pool Synthesis and Affinity-Based Selection. In: *Journal of the American Chemical Society* 120 (1998), Nr. 1, S. 30–36
- [84] NGUYEN, J. T. ; PORTER, M. ; AMOUI, M. ; MILLER, W. T. ; ZUCKERMANN, R. N. ; LIM, W. A.: Improving SH3 domain ligand selectivity using a non-natural scaffold. In: *Chemistry & Biology* 7 (2000), Nr. 7, S. 463–473
- [85] NIEBUHR, K. ; EBEL, F. ; FRANK, R. ; REINHARD, M. ; DOMANN, E. ; CARL, U. D. ; WALTER, U. ; GERTLER, F. B. ; WEHLAND, J. ; CHAKRABORTY, T.: A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. In: *The EMBO Journal* 16 (1997), Nr. 17, S. 5433–5444
- [86] NOCEDAHL, J. ; WRIGHT, S.: *Numerical Optimization*. Kap. Least-Square Problems, Springer Science+Business Media, New York, 2006
- [87] O'BRIEN, R. ; LADBURY, J. E. ; CHOWDHRY, B. Z.: Isothermal titration calorimetry of biomolecules. In: HARDING, Stephen E. (Hrsg.) ; CHOWDHRY, Babur Z. (Hrsg.): *Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry*. Oxford University Press, 2001, Kap. 10
- [88] OSTROMISLENSKY, I.: Über eine neue, auf dem Massenwirkungsgesetz fußnde Analysenmethode einiger binären Verbindungen. In: *European Journal of Inorganic Chemistry* 44 (1911), S. 268–273
- [89] PALENCIA, A. ; COBOS, E. S. ; MATEO, P. L. ; MARTÍNEZ, J. C. ; LUQUE, I.: Thermodynamic dissection of the binding energetics of proline-rich peptides to the Abl-SH3 domain: implications for rational ligand design. In: *Journal of Molecular Biology* 336 (2004), Nr. 2, S. 527–37

- [90] PEROZZO, R. ; FOLKERS, G. ; SCAPOZZA, L.: Thermodynamics of Protein–Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects. In: *Journal of Receptors and Signal Transduction* 24 (2004), Nr. 1-2, S. 1–52
- [91] PETTERSEN, E. F. ; GODDARD, T. D. ; HUANG, C. C. ; COUCH, G. S. ; GREENBLATT, D. M. ; MENG, E. C. ; FERRIN, T. E.: UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. In: *Journal of Computational Chemistry* 25 (2004), Nr. 13, S. 1605–1612
- [92] PHILIPPAR, U. ; ROUSSOS, E. T. ; OSER, M. ; YAMAGUCHI, H. ; KIM, H.-D. ; GIAMPIERI, S. ; WANG, Y. ; GOSWAMI, S. ; WYCKOFF, J. B. ; LAUFFENBURGER, D. A. ; SAHAI, E. ; CONDEELIS, J. S. ; GERTLER, F. B.: A Mena invasion isoform potentiates EGF-induced carcinoma cell invasion and metastasis. In: *Developmental Cell* 15 (2008), Nr. 6, S. 813–828
- [93] PREHODA, K. E. ; LEE, D. J. ; LIM, W. A.: Structure of the enabled/VASP homology 1 domain-peptide complex: a key component in the spatial control of actin assembly. In: *Cell* 97 (1999), S. 471–480
- [94] PRESS, W. H. ; TEUKOLSKY, S. A. ; VETTERLING, W. T. ; FLANNERY, B. P.: *Numerical Recipes in FORTRAN: the art of scientific computing, 2nd ed.* Cambridge University Press, Cambridge, 1992
- [95] R DEVELOPMENT CORE TEAM: *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing (Veranst.), 2011. – URL <http://www.R-project.org>. – ISBN 3-900051-07-0
- [96] REINHARD, M. ; GIEHL, K. ; ABEL, K. ; HAFFNER, C. ; JARCHAU, T. ; HOPPE, V. ; JOCKUSCH, B. M. ; WALTER, U.: The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. In: *The EMBO Journal* 14 (1995), Nr. 8, S. 1583–1589
- [97] REINHARD, M. ; HALBRÜGGE, M. ; SCHEER, U. ; WIEGAND, C. ; JOCKUSCH, B. M. ; WALTER, U.: The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. In: *The EMBO Journal* 11 (1992), Nr. 6, S. 2063–2070
- [98] REINHARD, M. ; JOUVENAL, K. ; TRIPIER, D. ; WALTER, U.: Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion

- and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1995), Nr. 17, S. 7956–7960
- [99] REINHARD, M. ; RÜDIGER, M. ; JOCKUSCH, B. M. ; WALTER, U.: VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. In: *FEBS Letters* 399 (1996), Nr. 1-2, S. 103–107
- [100] RENFRANZ, P. J. ; BECKERLE, M. C.: Doing (F/L)PPPPs: EVH1 domains and their proline-rich partners in cell polarity and migration. In: *Current Opinion in Cell Biology* 14 (2002), Nr. 1, S. 88–103
- [101] REUTER, C.: *Stereoselektive Synthese neuer Sekundärstrukturmetika von Peptiden in PPII-Konformation*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln, Dissertation, 2011
- [102] RICKLES, R. J. ; BOTFIELD, M. C. ; ZHOU, X. M. ; HENRY, P. A. ; BRUGGE, J. S. ; ZOLLER, M. J.: Phage display selection of ligand residues important for Src homology 3 domain binding specificity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1995), Nr. 24, S. 10909–10913
- [103] RUZZA, P. ; SILIGARDI, G. ; DONELLA-DEANA, A. ; CALDERAN, A. ; HUSSAIN, R. ; RUBINI, C. ; CESARO, L. ; OSLER, A. ; GUIOTTO, A. ; PINNA, L. A. ; BORIN, G.: 4-Fluoroproline derivative peptides: effect on PPII conformation and SH3 affinity. In: *Journal of Peptide Science* 12 (2006), Nr. 7, S. 462–471
- [104] SACHS, L. ; HEDDERICH, J.: *Angewandte Statistik – Methodensammlung mit R*. 13. Auflage. Springer-Verlag, 2009
- [105] SAMARIN, S. ; ROMERO, S. ; KOCKS, C. ; DIDRY, D. ; PANTALONI, D. ; CARLIER, M.-F.: How VASP enhances actin-based motility. In: *The Journal of Cell Biology* 163 (2003), Nr. 1, S. 131–142
- [106] SARASTE, M. ; HYÖVNEN, M.: Pleckstrin homology domains: a fact file. In: *Current Opinion in Structural Biology* 5 (1995), Nr. 3, S. 403–408
- [107] SAYYED, F. B. ; SURESH, C. H.: Substituent effects in cation- $\pi$  interactions: a unified view from inductive, resonance, and through-space effects. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 115 (2011), Nr. 22, S. 5660–5664

- [108] SHI, Z. ; WOODY, R. W. ; KALLENBACH, N. R.: Is polyproline II a major backbone conformation in unfolded proteins? In: *Advances in Protein Chemistry* 62 (2002), S. 163–240
- [109] STAPLEY, B. J. ; CREAMER, T. P.: A survey of left-handed polyproline II helices. In: *Protein Science* 8 (1999), Nr. 3, S. 587–595
- [110] STEINBERG, I. Z. ; HARRINGTON, W. F. ; BERGER, A. ; SELA, M. ; KATCHALSKI, E.: The configurational changes of poly-L-proline in solution. In: *Journal of the American Chemical Society* 82 (1960), Nr. 20, S. 5263–5279
- [111] STERN, O. ; VOLMER, M.: Über die Abklingungszeit der Fluoreszenz. In: *Physikalische Zeitschrift* 20 (1919), S. 183–188
- [112] TOYODA, A. ; KAWANA, H. ; AZUHATA, K. ; YU, J. ; OMATA, A. ; KISHI, H. ; HIGASHI, M. ; HARIGAYA, K.: Aberrant expression of human ortholog of mammalian enabled (hMena) in human colorectal carcinomas: implications for its role in tumor progression. In: *International Journal of Oncology* 34 (2009), Nr. 1, S. 53–60
- [113] VASIOUKHIN, V. ; BAUER, C. ; YIN, M. ; FUCHS, E.: Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. In: *Cell* 100 (2000), Nr. 2, S. 209–219
- [114] VEIS, A. ; NAWROT, C. F.: Basicity Differences among Peptide Bonds. In: *Journal of the American Chemical Society* 92 (1970), Nr. 13, S. 3910–3914
- [115] VELAZQUEZ-CAMPOY, A. ; FREIRE, E.: Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. In: *Nature Protocols* 1 (2006), Nr. 1, S. 186–91
- [116] VELAZQUEZ-CAMPOY, A. ; LEAVITT, S. A. ; FREIRE, E.: Characterization of Protein–Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. In: FU, H. (Hrsg.): *Protein–Protein Interactions: Methods and Applications*. Humana Press Inc., Totowa, 2004, S. 35–54
- [117] WITTER, D. J. ; FAMIGLIETTI, S. J. ; CAMBIER, J. C. ; CASTELHANO, A. L.: Design and synthesis of SH3 domain binding ligands: modifications of the consensus sequence XPPXP. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 8 (1998), Nr. 22, S. 3137–3142

- [118] ZAMINER, J.: *Stereoselektive Synthese struktureller Mimetika für Prolin-Prolin-Dipeptide mit PPII-Helix-Konformation als Baustein für neue Liganden der VASP-EVH1-Domäne*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln, Dissertation, 2005
- [119] ZAMINER, J. ; BROCKMANN, C. ; HUY, P. ; OPITZ, R. ; REUTER, C. ; BEYERMANN, M. ; FREUND, C. ; MÜLLER, M. ; OSCHKINAT, H. ; KÜHNE, R. ; SCHMALZ, H.-G.: Addressing Protein–Protein Interactions with Small Molecules: A Pro-Pro Dipetide Mimic with a PPII Helix Conformation as a Module for the Synthesis of PRD-Binding Ligands. In: *Angewandte Chemie International Edition in English* 49 (2010), S. 7111–7115
- [120] ZHANG, Y. ; TU, Y. ; GKRETSI, V. ; WU, C.: Migfilin interacts with vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) and regulates VASP localization to cell-matrix adhesions and migration. In: *The Journal of Biological Chemistry* 281 (2006), Nr. 18, S. 12397–12407
- [121] ZIMMERMANN, J. ; KÜHNE, R. ; VOLKMER-ENGERT, R. ; JARCHAU, T. ; WALTER, U. ; OSCHKINAT, H. ; BALL, L. J.: Design of N-substituted peptomer ligands for EVH1 domains. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 38, S. 36810–36818