

Untersuchung zur Faltung, Stabilität und zum Bindungsverhalten kleiner β -Faltblattstrukturen am Beispiel der FBP28 WW-Domäne

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

ana örner

(geb. Przeździak)

aus Berlin

August, 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Oschkinat

2. Gutachter: Prof. Dr. Beate Koksch

Disputation am 31.01.2008

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung/summary	6
1.1 Zusammenfassung	6
1.2 summary	8
2 Abkürzungsverzeichnis/Definitionen	10
2.1 Abkürzungsverzeichnis	10
2.2 Definitionen	13
3 Einleitung	16
3.1 Proteinstrukturen	16
3.2 Biophysikalische Methoden zur Analyse von β -Faltblattstrukturen . . .	17
3.3 Proteinfaltung und Fehlfaltung	19
3.4 WW-Domänen	20
3.5 Untersuchung der Faltung, Stabilität und des Bindungsverhaltens	23
3.6 Peptidsynthese als Werkzeug für die Analyse der Faltung, Stabilität und des Bindungsverhaltens	25
3.7 Die FBP28 WW-Domäne	27
3.8 Festphasensynthese der FBP28 WW-Domäne	29
4 Zielstellung	33
5 Material und Methoden	34
5.1 Festphasensynthese	34
5.1.1 Chemikalien	34
5.1.2 Synthese	35
5.2 SPOT-Synthese	36
5.2.1 Chemikalien	36
5.2.2 SPOT-Synthese mit gängigen AS	37
5.2.3 SPOT-Synthese mit nichtgängigen AS (Pseudoproline, unnatürli- che AS)	38

5.2.4	Analytik der SPOT-Synthese	39
5.2.5	Koppeln von gereinigten Peptiden über eine Maleimidfunktion	39
5.2.6	Bindungsstudien	40
5.3	CD-Messungen	40
5.3.1	Aufnahme der Spektren	40
5.3.2	Bestimmung der Schmelzpunkte	41
5.4	SPR-Spektroskopie	42
5.5	NMR-Spektroskopie	42
5.6	Synthese der Rückgrat-mutierten Bausteine	43
5.7	ITC-Messungen	44
6	Ergebnisse und Diskussion	45
6.1	Festphasensynthese der FBP28 WW-Domäne	45
6.2	SPOT-Synthese der FBP28-D15N WW-Domäne	50
6.3	Ligand für die FBP28-D15N WW-Domäne	52
6.4	Komplette Substitutionanalyse der FBP28-D15N WW-Domäne	57
6.4.1	Visualisierung der ligandenbindenden Domänen-Varianten	57
6.4.2	Visuelle Auswertung der Substitutionsanalyse der FBP28-D15N WW-Domäne - Die Variabilität	62
6.4.3	Längenanalyse der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne	65
6.4.4	Einzelbetrachtungen bestimmter Bereiche der Substitutionsanalyse in Hinblick auf Ligandenbindung und Rückschlüsse auf die Stabilität der Domäne	67
6.5	Grenzen der SPOT-Technik	69
6.6	Biophysikalische Untersuchung ausgewählter Mutanten aus der Substitutionsanalyse	70
6.7	Die hydrophoben Cluster der FBP28-D15N WW-Domäne	75
6.7.1	Einfluss der aromatischen Hydroxylgruppe auf Faltung und Bindung zum Liganden	77
6.7.2	Einfluss des Aromaten auf Faltung und Bindung zum Liganden	79
6.7.3	Untersuchung zu Kationen-Aromat-Wechselwirkungen in den hydrophoben Clustern	81
6.7.4	Weitere Varianten der Tyr-Positionen der hydrophoben Cluster	84
6.8	Ligandenunterstützte Stabilisierung der Faltung	87
6.9	Mutation des Rückgrates im hydrophoben Cluster der FBP28-D15N WW-Domäne	91

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	5
---------------------------	---

7 Ausblick	99
-------------------	-----------

Literaturverzeichnis	100
-----------------------------	------------