

1 Zusammenfassung/summary

1.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit diente die FBP28 WW-Domäne als Modell zur Untersuchung und Aufdeckung von Faktoren, die sowohl die Faltungstabilität als auch die Ligandenbindungsfähigkeit beeinflussen. Hierbei wurde von der Tatsache Gebrauch gemacht, dass WW-Domänen im Allgemeinen kleine, spontan faltende Spezies darstellen, welche sich in der Regel gut synthetisieren lassen. In ihrer nativ-globulären Form bilden WW-Domänen ein stabiles, dreisträngiges β -Faltblatt mit zusätzlichem hydrophobem Kern. In dieser Arbeit werden auf Basis synthetischer FBP28 WW-Domänenvarianten umfangreiche Affinitäts- und Stabilitätsstudien vorgestellt.

Im ersten Abschnitt wurde, basierend auf den Arbeiten von Tremmel et al. [1], ein optimiertes SPOT-Syntheseprotokoll entwickelt, welches eine reproduzierbare und effiziente chemische Synthese der FBP28 WW-Domäne gewährleistete. Darauf aufbauend wurden dann umfangreiche Synthesen durchgeführt, bei denen zunächst jede Sequenzposition der WW-Domäne gegen jede der 20 gencodierten Aminosäuren ausgetauscht wurden. Insgesamt wurden 672 Substitutionsvarianten der FBP28 WW-Domäne in Form eines zellulosegebundenen Domänenarrays hergestellt. Dieses Array wurde dann auf Bindung zu einem Peptid-Liganden durchmustert. Als Ergebnis konnten für jede Aminosäureposition der FBP28 WW-Domäne Aussagen über deren Wichtigkeit für die Ligandenbindung und/oder Stabilität getroffen werden. Da diese Ergebnisse auf der Basis einer Arraystudie keine verlässlichen quantitativen Aussagen erlauben und im Falle der Stabilität eher indirekter Natur sind, wurden für mehrere ausgesuchte Vertreter mittels biophysikalischer Experimente sowohl deren Ligandenbindungsaffinitäten als auch Stabilitäten quantitativ bestimmt. Zusammenfassend lässt sich formulieren:

1. Die Experimente dieser Arbeit zeigen, dass Trp8, Tyr20 und Pro33 für die Stabilität, Tyr11, Tyr19, Tyr21 und Trp30 in erster Linie für die Bindungsfähigkeit der Domäne verantwortlich sind.

2. Die überraschende Invariabilität der Aminosäuren Asn22 und Thr25 im Bereich der zweiten Schleife konnte durch die Ausbildung eines Interaktionsnetzwerkes erklärt werden.
3. Die ligandeninduzierte Stabilisierung der Domäne konnte am Beispiel der KT(12,13)E-Variante mit dem gefundenen Polyprolin-Liganden klar gezeigt werden.

Weiterführende Studien, bei denen die aromatischen hydrophoben Clusterpositionen Tyr11, Tyr19, Tyr20 und Tyr21 insbesondere durch Zylohexylalanin ausgetauscht wurden, zeigten:

1. Zur Stabilität der Domäne ist an der Position 20 ein Aromat (Tyr oder Phe) unumgänglich.
2. Die Positionen 11, 19 und 21 können ohne Stabilitätsverlust, jedoch unter Einbuße der Ligandenbindefähigkeit gegen den aliphatischen Baustein Zylohexylalanin ausgetauscht werden.

Letztlich wurden Rückgrat-Substitutionsvarianten durch Einbau von Dipeptidisosterbausteinen (Amin- bzw. E-Alkenbindung statt Amidbindung) synthetisiert. Nach erfolgreicher Synthese ergaben die biophysikalischen Studien, dass ungefaltete Spezies vorhanden waren. Daraus ist zu schließen, dass die Wasserstoffbrücken im hydrophoben Cluster essentiell sind und auch nicht durch die Bildung eines hydrophoben Clusters kompensiert werden können.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in *ChemBioChem*, 7(5) auf den Seiten 780-788 (2006) veröffentlicht.

1.2 summary

In this work the FBP28 WW-domain was used as a model for investigations of factors affecting folding stability and ligand specificity. WW-domains are small and spontaneously folded modules, which usually can be synthesized easily. In their native globular form they build a stable, three-stranded β -sheet with a hydrophobic core. In this work comprehensive studies for affinity and stability will be presented based on synthetic FBP28 WW-domain variants.

In the first part of the study an optimized SPOT-synthesis protocol according to the work of Tremmel et al. [1] has been developed. This protocol allowed an efficient and reproducible chemical synthesis of the FBP28 WW-domain. Based on this protocol, comprehensive syntheses have been done, where each sequence position of the WW-domain has been substituted against each of the 20 gene-encoded amino acids. In total, 672 substitution variants of the FBP28 WW-domain were synthesized in the form of a cellulose-bound domain array. This array was then probed for binding to a peptide ligand. As a result it was possible to characterize the importance of every sequence position of the FBP28 WW-domain for ligand binding and/or stability. As these results, based on an array study, are quantitatively not reliable and can only state indirect information about stability of the domain variants, several selected variants were quantitatively investigated via biophysical methods for ligand binding affinity and stability. As a result it could be formulated:

1. The experiments revealed, that Trp8, Tyr20, and Pro33 are important for the stability of the FBP28 WW-domain, while Tyr11, Tyr19, Tyr21, and Trp30 are predominantly important for binding.
2. The surprising invariability of the amino acids Asn22 and Thr25 in the second turn region could be explained with the formation of an interaction network.
3. The ligand-induced stabilisation of the domain could clearly be shown with the variant KT(12,13)E.

Further studies, where the aromatic cluster positions Tyr11, Tyr19, Tyr20 and Tyr21 were substituted by cyclohexylalanine, showed:

1. An aromatic amino acid (Tyr or Phe) at position 20 is essential for the stability of the domain.
2. Positions 11, 19 and 21 can be substituted by cyclohexylalanine without reduction of stability, but loss of the ability to bind the ligand.

Finally, backbone-substitution variants were synthesized by insertion of dipeptide isomers (amine- and E-alkene bond instead of an amide bond). After successful synthesis, only unfolded species could be identified using biophysical studies. This demonstrates, that hydrogen bonds are essential within the hydrophobic cluster and cannot be compensated by the formation of a hydrophobic cluster.

Parts of this thesis were published in the journal *ChemBioChem*, 7(5), p. 780-788 (2006).