

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Festphasensynthese der FBP28 WW-Domäne

Für die Untersuchungen zur Stabilität, Faltungs- und Bindungsverhalten der FBP28 WW-Domäne war es nötig, ein optimiertes Syntheseverfahren in der Hand zu haben, welches die Synthese der Domäne als auch die Substitutionsvarianten in guter Ausbeute und Reinheit gewährleistet. Hierfür wurde sich auf die von Sandra Tremmel eingeführten Modifikationen (siehe Seite 29, Einsatz von Pseudoprolin und Austausch von Asp15 gegen Asn15) gestützt.

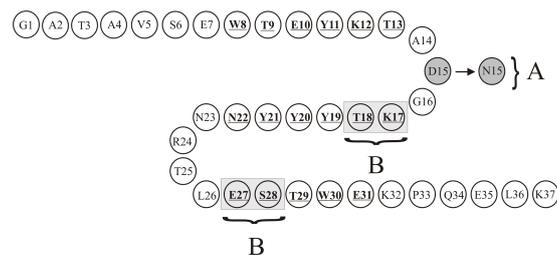


Abbildung 6.1: Schema der FBP28-D15N WW-Domäne mit den Modifikationen für die Synthese.

A) Austausch des Aspartats gegen ein Asparagin zur Vermeidung der Bildung eines Aspartimid

B) Einsatz der Pseudoprolinbausteine in Position 17/18 (Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{Me,Me}pro$)-OH) und 27/28 (Fmoc-Glu(OtBu)-Ser($\Psi^{Me,Me}pro$)-OH)

Abbildung 6.1 faßt noch einmal die angewandten Modifikationen der Synthese zusammen. Die benutzten Pseudoprolinbausteine (siehe Abbildung 6.1) waren die kommerziell erhältlichen (Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{Me,Me}pro$)-OH) und Fmoc-Glu(OtBu)-Ser($\Psi^{Me,Me}pro$)-OH). Die Synthese verlief nach dem Standard-Fmoc-Synthese-Protokoll [114], wobei in dieser Arbeit PyBOP für alle Kopplungen verwendet wurde.

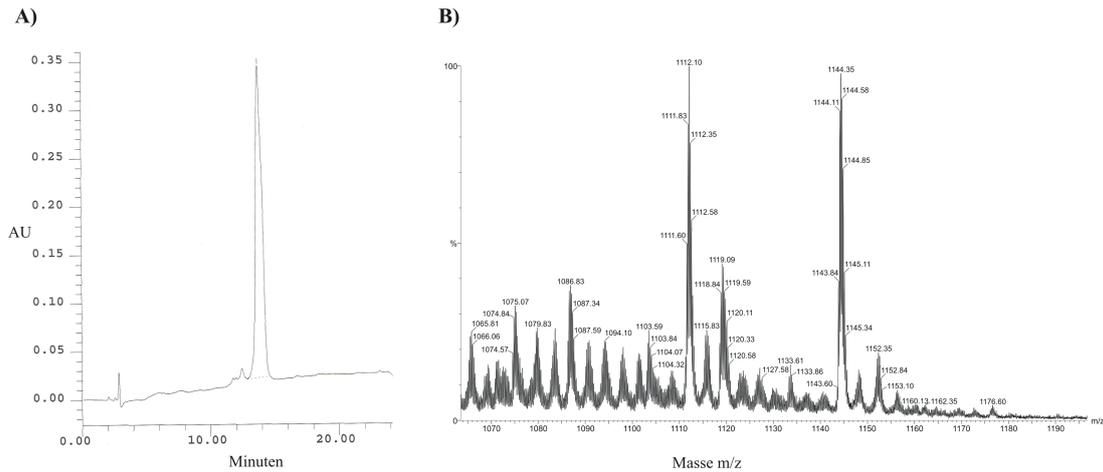


Abbildung 6.2: Analyse der mit SPPS synthetisierten FBP28-D15N (1-37) WW-Domäne mit einem N-terminalen Cystein und einer Aminohexansäure, Masse (berechnet) = 4571,11 g/mol

A) RP-HPLC Chromatogramm des Rohproduktes, $R_t = 13,7$ min. Die Peakflächenintegration des Hauptpeaks entspricht 100 % Reinheit.

B) ESI-MS-Spektrum, Detektion von zwei vierfach geladenen Produkten,

1. Hauptpeak: monoisotopische Masse (gefunden) $m/z = 1143,84$ $[M+4H]^{4+}$ (entspricht dem gewünschten Produkt, $M = 4571,36$ g/mol)

2. Hauptpeak: monoisotopische Masse (gefunden) $m/z = 1111,60$ $[M+4H]^{4+}$ (entspricht einer Masse von $M = 4442,40$ g/mol)

Die Differenz von 128,96 g/mol entspricht einer Fehlsequenz, in der ein Glycin und ein Alanin nicht vorhanden sind.

Die Analyse des Rohproduktes mittels analytischer RP-HPLC (Abbildung 6.2 A) zeigt einen scharfen Peak bei 13,7 min, der auf ein einheitliches Produkt mit einer Reinheit von 100 % schließen ließ. Allerdings zeigte die massenspektroskopische Analyse zwei Hauptpeaks (Abbildung 6.2 B). Die Werte für m/z an den Peaks stellen verschiedene Massen ein und desselben Produktes mit unterschiedlichen Isotopenverteilungen der gesamten Elemente des Peptides dar. Um einen direkten Vergleich zwischen gemessener und berechneter Masse zu erhalten, werden die monoisotopischen Massen (Summe aller kleinsten Isotope im Peptid) verwendet. Bei den zwei Hauptpeaks der massenspektroskopischen Analyse der FBP28-D15N (1-37) WW-Domäne handelt es sich um die vierfach geladenen Produkte mit $m/z = 1143,84$ $[M+4H]^{4+}$ und $m/z = 1111,60$ $[M+4H]^{4+}$. Somit ergeben sich sowohl die Massen 4571,36 g/mol, was der berechneten Masse der gewünschten WW-Domäne entspricht, als auch ein Peptid mit der Masse 4442,40 g/mol. Letzteres spricht für eine unvollständige Domäne. In der Tat entspricht

die Differenz der Massen einer Gly-Ala-Fehlsequenz. Es liegt daher nahe, dass die beiden N-terminalen Aminosäuren Gly und Ala unter den gewählten Bedingungen nur unvollständig koppeln.

Aus den NMR-Strukturen der FBP28 WW-Domäne in der Arbeit von Macias et al. [55] geht hervor, dass die ersten drei AS der FBP28 WW-Domäne (Gly1-Ala2-Thr3) nicht am Faltblatt beteiligt sind. Eine Verkürzung sollte daher keine Änderung in der Faltung zur Folge haben. Mit dieser Erkenntnis wurde eine verkürzte FBP28-D15N WW-Domäne, wie beschrieben, synthetisiert.

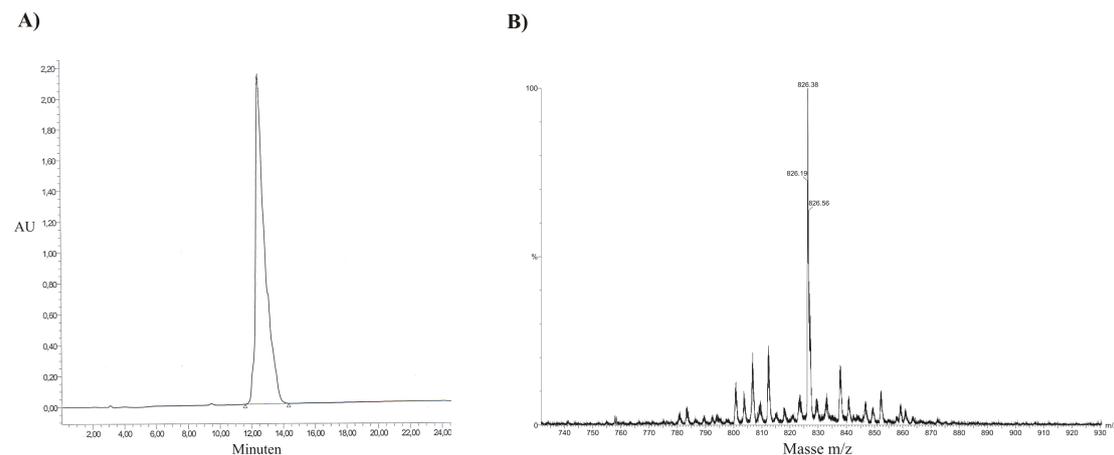


Abbildung 6.3: Analyse der mit SPPS synthetisierten FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne.

A) RP-HPLC Chromatogramm, $R_t = 12,5$ min und die Peakflächenintegration des Hauptpeaks entspricht 100 % Reinheit.

B) ESI-Massenspektrum, Hauptpeak: Masse (berechnet) 4125,99 g/mol, Masse (gefunden) = m/z 826,19 $[M+5H]^{5+}$ (entspricht 4125,95 g/mol)

Mittels RP-HPLC (Abbildung 6.3 A) konnte ein reines Produkt mit der gewünschten Masse (Abbildung 6.3 B, ESI-TOF-MS, monoisotopische Masse (berechnet) $M = 4125,99$ g/mol, monoisotopische Masse (gefunden) $m/z = 826,19 [M+5H]^{5+}$ (entspricht 4125,95 g/mol) nachgewiesen werden. Trotz der Verkürzung der Domäne konnte ein korrekt gefaltetes β -Faltblatt mittels CD-Spektroskopie nachgewiesen werden (siehe Tabelle 6.1 auf Seite 49). Weitere biophysikalische Untersuchungen werden in Abschnitt 6.6 besprochen.

Nach der Arbeit von Macias et al. [55] ist aus den NMR-Daten der FBP28 WW-Domäne ebenfalls zu entnehmen, dass die drei C-terminalen AS Glu35-Leu36-Lys37 ebenfalls nicht direkt an der Stabilität des β -Faltblattes beteiligt sind. So kann auch angenom-

men werden, dass eine FBP-D15N WW-Domäne mit einer Länge von Ala4-Gln34 in der Faltung nicht beeinflusst wird. Die Synthese wurde mit den beschriebenen Modifikationen durchgeführt.

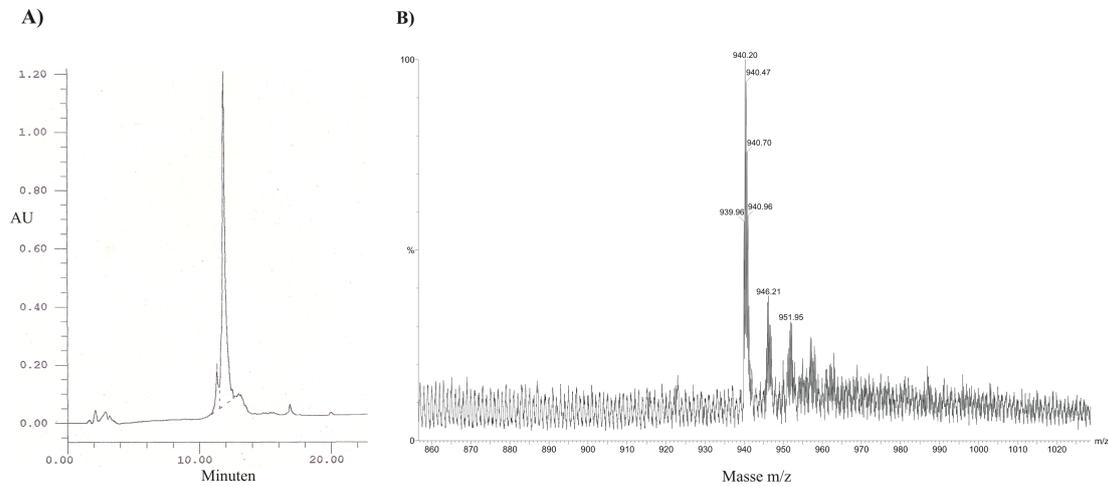


Abbildung 6.4: Analyse der mit SPPS synthetisierten FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne.

A) RP-HPLC Chromatogramm, $R_t = 11,8$ min und dessen Peakflächenintegration entspricht 91 % Reinheit.

B) ESI-MS-Spektrum der FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne, Detektion des vierfach geladenen Produkts (Hauptpeak), Nebenpeaks = Natriumaddukte

monoisotopische Masse (berechnet) = 3755,77 g/mol

Masse (gefunden) = m/z 939,96 $[M+4H]^{4+}$ (entspricht 3755,84 g/mol)

Der Hauptpeak des ESI-Spektrums (siehe Abbildung 6.4 B) repräsentiert das erwünschte Produkt Ala4-Gln34. Die Nebenpeaks zeigen Natriumaddukte. Der hier dargestellte Peak zeigt ein vierfach geladenes Produkt. Die gefundene monoisotopische Masse 3755,84 g/mol entspricht der gewünschten FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne. Mittels CD-Spektroskopie konnte eine korrekte Faltung eines β -Faltblattes nachgewiesen werden (siehe Tabelle 6.1 auf Seite 49). Die Reinheit des Produktes betrug nach Analyse mit RP-HPLC 91%. Analog dem beschriebenen Syntheseprotokoll (siehe Seite 29) wurden alle Varianten der FBP28 WW-Domäne hergestellt, welche für die biophysikalischen und biochemischen Versuche verwendet wurden. Tabelle 6.1 fasst ihre Ergebnisse zusammen. Dabei werden die Domänenvarianten mit ihren Sequenzen, Abkürzungen (diese werden im Weiteren verwendet), Faltungsstatus und Schmelzpunkten (mittels CD-Spektroskopie) sowie Dissoziationskonstanten (mittels SPR-Spektroskopie) dargestellt.

Name	FBP WW-Domänen Sequenz	Gefaltet?	T _m [°C]*	K _d [μM]
wt(4-37)**	GATAVSEWTEYKTADGKTYYYNRTLESTWEKPQELK	+****	62***	510±81
D15N (4-34)	AVSEWTEYKTANGKTYYYNRTLESTWEKPQ	+	48	427±4
D15N (4-37)	AVSEWTEYKTANGKTYYYNRTLESTWEKPQELK	+	60	223±60
D15N(7-34)	EWTEYKTANGKTYYYNRTLESTWEKPQELK	+	19	470
W8Y	AVSEYTEYKTANGKTYYYNRTLESTWEKPQELK	+	17	336±106
T13A	AVSEWTEYKANGKTYYYNRTLESTWEKPQELK	+	49	338±81
E31V	AVSEWTEYKTANGKTYYYNRTLESTWVKPQELK	+	60	292±115
L26S	AVSEWTEYKTANGKTYYYNRTSESTWEKPQELK	+	59	534±261
KT(12,13)E	AVSEWTEY-EANGKTYYYNRTLESTWEKPQELK	+	32	600±228
RT(24,25)A	AVSEWTEYKTANGKTYYYN-ALESTWEKPQELK	-	n.q.	n.q.
ES(27,28)E	AVSEWTEYKTANGKTYYYNRTL-ETWEKPQELK	-	n.q.	n.q.
KT(17,18)P	AVSEWTEYKTANG-PYYNNRTLESTWEKPQELK	+	32	802±53
N22A	AVSEWTEYKTANGKTYYYANRTLESTWEKPQELK	(+)	n.q.	n.d.
T25D	AVSEWTEYKTANGKTYYYNRDLESTWEKPQELK	(+)	n.q.	n.d.
RT(24,25)T	AVSEWTEYKTANGKTYYYN-TLESTWEKPQELK	(+)	n.q.	n.q.
Y11F	AVSEWTEFKTANGKTYYYNRTLESTWEKPQELK	+	57	309±67
Y19F	AVSEWTEYKTANGKTFYYNRTLESTWEKPQELK	+	56	285±75
Y20F	AVSEWTEYKTANGKTYFYNNRTLESTWEKPQELK	+	44	507±41
Y21F	AVSEWTEYKTANGKTYFNNRTLESTWEKPQELK	+	57	467±81
Y11Cha	AVSEWTEChaKTANGKTYYYNRTLESTWEKPQELK	+	61	n.q.
Y19Cha	AVSEWTEYKTANGKChaYNNRTLESTWEKPQELK	+	66	n.q.
Y20Cha	AVSEWTEYKTANGKTYChaYNNRTLESTWEKPQELK	-	24	n.q.
Y21Cha	AVSEWTEYKTANGKTYChaNNRTLESTWEKPQELK	+	62	n.q.
Y11R	AVSEWTERKTANGKTYYYNRTLESTWEKPQELK	+	61	n.d.
Y19R	AVSEWTEYKTANGKTRYNNRTLESTWEKPQELK	(+)	n.q.	n.d.
Y20R	AVSEWTEYKTANGKTRYNNRTLESTWEKPQELK	-	32	n.d.
Y21R	AVSEWTEYKTANGKTYRNNRTLESTWEKPQELK	+	56	n.d.
W30R	AVSEWTEYKTANGKTYYYNRTLESTREKPQELK	+	46	n.d.
Y11L	AVSEWTELKTANGKTYYYNRTLESTWEKPQELK	+	22	n.d.
Y11D	AVSEWTEDKTANGKTYYYNRTLESTWEKPQELK	+	46	n.d.
Y19L	AVSEWTEYKTANGKTLYYNNRTLESTWEKPQELK	(+)	54	n.d.
Y19D	AVSEWTEYKTANGKTDYYNNRTLESTWEKPQELK	-	n.q.	n.d.
Y20L	AVSEWTEYKTANGKTYLYNNRTLESTWEKPQELK	-	n.q.	n.d.
Y20D	AVSEWTEYKTANGKTYDYNNRTLESTWEKPQELK	-	46	n.d.
Y21L	AVSEWTEYKTANGKTYLNNRTLESTWEKPQELK	+	57	n.d.
Y21D	AVSEWTEYKTANGKTYDNNRTLESTWEKPQELK	+	n.q.	n.d.
Y20Y21-Amin	AVSEWTEYKTANGKTY-CH ₂ -NH-YNNRTLESTWEKPQELK	-	n.q.	n.q.
Y19Y20-Amin	AVSEWTEYKTANGKTY-CH ₂ -NH-YNNRTLESTWEKPQELK	-	n.q.	n.q.
Y20Y21-E-Alken	AVSEWTEYKTANGKTY-C ₂ H ₂ -YNNRTLESTWEKPQELK	-	n.q.	n.q.
Y19Y20-E-Alken	AVSEWTEYKTANGKTY-C ₂ H ₂ -YNNRTLESTWEKPQELK	-	n.q.	n.q.

Tabelle 6.1: Die 40 synthetisch hergestellten FBP28 WW-Domänenvarianten mit Angaben zu Faltungszustand, Schmelzpunkt T_m und Dissoziationskonstante K_d zum Liganden PPPLIPPPPLPPPLIPPPPLPP.

N = AS, die für die Synthese modifiziert werden musste, A = AS, die die Mutation der Domäne kennzeichnet

-E = eine Mutation an einer Pseudoprolinposition durch eine einzige AS. Aus einem Dipetid wird eine einzige AS.

+ = gefaltet, - = nicht gefaltet, (+) = Faltung nicht gut ausgeprägt, n.q. = nicht quantifizierbar, n.d. = nicht determiniert

Der Faltungszustand wurde mit CD-Spektroskopie und die Dissoziationskonstante mit SPR bestimmt.

*Die Standardabweichung des T_m beträgt ±1°C, aus drei Messungen der FBP28-D15N (4-37) bestimmt,

hergestellt von Irene Coin (FMP-Berlin), *Wert von Macias et al. [55], **** gemessen von Sandra Tremmel (FMP-Berlin)

6.2 SPOT-Synthese der FBP28-D15N WW-Domäne

Für den weiteren Fortgang der Arbeit wurde überprüft, ob die FBP28 WW-Domäne auch mittels der SPOT-Technologie an einer Zellulosemembran synthetisiert werden kann. Hierzu wurde auf die bisherigen Erfahrungen der Festphasensynthese zurückgegriffen, wobei zunächst auf den Einbau der Pseudoprolinbausteine verzichtet wurde. Analog dem Standard-SPOT-Syntheseprotokoll [134] wurde versucht, die verkürzte FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne auf einer Zellulosemembran herzustellen. Die Spotgröße betrug $0,25 \text{ cm}^2$. Für die Analytik wurde ein Array aus mehreren Analysespot-Tripel (für eine ausreichende Menge an Analysematerial) synthetisiert, die je die gleiche AS-Sequenz enthielten. Das erste Tripel repräsentierte die FBP-Teilsequenz (31-34), das nächste Tripel die Teilsequenz (30-34), das nächste Tripel die Teilsequenz (29-34) usw.. Dies wurde bis zur Komplettierung der vollständigen Sequenz der FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne durchgeführt. Anschließend wurden die Peptide mit Ammoniakgas von der Membran gelöst und massenspektroskopisch (ESI-MS) untersucht. Das längste, nachweisbare Fragment umfasste die Teilsequenz (23-34) aus der FBP28-D15N (4-34) Sequenz (Abbildung 6.5). Aufgrund dieses Ergebnisses war es unumgänglich, für die SPOT-Synthese ebenfalls Pseudoprolinbausteine zu verwenden.

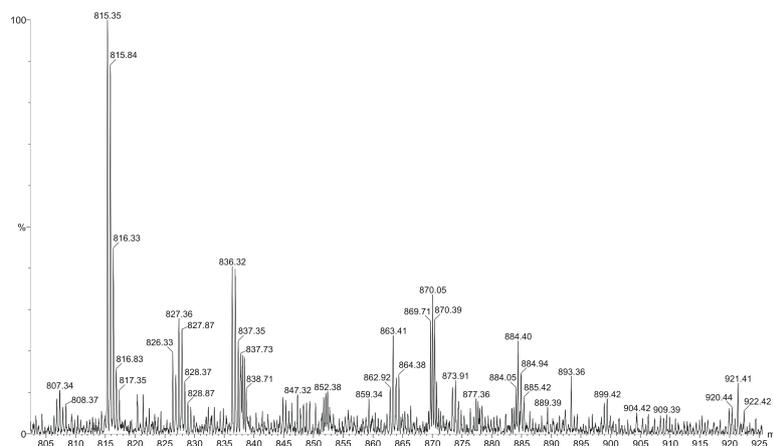


Abbildung 6.5: ESI-MS-Spektrum eines Teilstücks der FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne : TEYKTANGKTYYYNNRTLESTWEKPQ- β A β A. Dieser Teil wurde ohne die Hilfe von Pseudoprolinen synthetisiert. Der Hauptpeak zeigt eine Masse m/z 815,35 $[M+2H]^{2+}$, was einer Abbruchsequenz von NRTLESTWEKPQ- β A β A entspricht.

Zur Ermittlung der bestmöglichen Kupplungschemie für die Pseudoprolinbausteine auf der Zellulosemembran wurden folgende Reagenzien getestet, wobei der Baustein jeweils auf eine Zellulose-gebundene Testsequenz gekoppelt wurde.

Pseudoprolinbaustein : EEDQ = 1 : 1

Pseudoprolinbaustein : HATU : DIPA = 1 : 1 : 2

Pseudoprolinbaustein : PyBOP : NMM = 1 : 1 : 2

Nach Abspaltung von der Membran konnte durch massenspektroskopische sowie RP-HPLC Analyse gezeigt werden, dass alle drei Kupplungsmethoden mit nahezu gleicher Effizienz arbeiten. Aufgrund der einfachen Handhabung und nicht zuletzt wegen der geringen Kosten wurde EEDQ gewählt.

Mit dem Einsatz der Pseudoprolin, wie von Sandra Tremmel beschrieben, war die Synthese erfolgreich. Die Ausbeute an Produkt auf der Membran nach der kompletten Synthese betrug 16 %. Dieser Wert wurde als Differenz der Fmoc-Analysen (siehe Seite 37) der Grundbeladung und nach der Beendigung der Synthese bestimmt. Mit RP-HPLC und ESI-MS konnte die komplette FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne (Masse (berechnet) 4270,60 g/mol, Masse (gefunden) $m/z = 4270,13 [M+H]^+$) mit einer Reinheit von 65 % nachgewiesen werden (Abbildung 6.6).

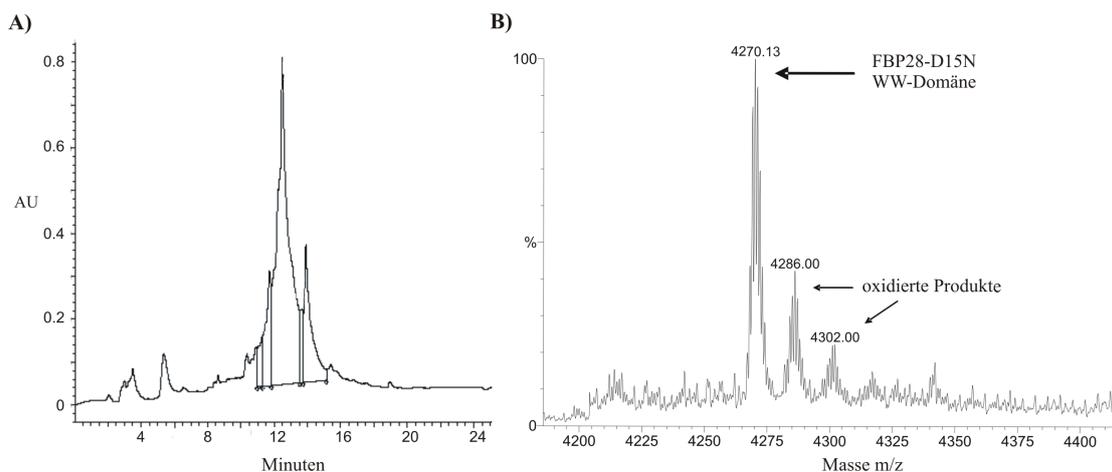


Abbildung 6.6: Analyse des Rohproduktes der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne, synthetisiert mittels SPOT-Synthese. Die Domäne (drei Analysespots mit einer Fläche von $0,25 \text{ cm}^2$) wurde mit Ammoniakgas von der Membran abgespalten, in Wasser gelöst und analysiert.

A) RP-HPLC Chromatogramm, die Peakflächenintegration des Hauptpeaks entspricht 65 % Reinheit.

B) ESI Massenspektrum, Hauptpeak: Masse (berechnet) 4270,60, Masse (gefunden) $m/z 4270,13 [M+H]^+$

6.3 Ligand für die FBP28-D15N WW-Domäne

Für die Studien an zellulosegebundenen FBP28-D15N WW-Domänenvarianten war das Auffinden eines spezifischen, möglichst kurzen, Peptid-Liganden entscheidend. Bisherige Publikationen konnten einen solchen nicht aufzeigen. Es ist bekannt, dass WW-Domänen prolinreiche Sequenzen binden [50, 45, 61, 43]. FBP heißt Formin-bindendes Protein [135] und in der Arbeit von Chan et al. [136] wurden verschiedene prolinreiche Sequenzen aus dem Formin (Swiss-Prot Nummer: Q05859, Formin aus der Maus) als Ligand getestet. Dabei konnte jedoch keine Steigerung der Bindungsaffinität zu verschiedenen Sequenzen aus dem Formin im Vergleich zu anderen FBP-Domänen (FBP11 und FBP21), die in der Arbeit von Chan et al. [136] getestet wurden, beobachtet werden. Andere Arbeiten befassten sich mit der Gruppierung der WW-Domänen bezüglich ihrer Bindungsspezifität [137, 57, 69]. Aus diesen Arbeiten geht hervor, dass die "Formin-bindenden Proteine" allgemein in die Gruppe III (Motiv PPR) eingeordnet werden können. Hu et al. [138] testeten alle humanen WW-Domänen bioinformatisch und biochemisch auf ihre Bindungsspezifität und stützten sich dabei auf bereits bekannte Bindungsmotive. Danach wurde die FBP28 WW-Domäne in die Bindungsklasse II/III eingeordnet, was einem Bindungsmotiv von PPLP/[LP]PR[PYA], PxxGMxPP, PPGPPP oder PPPPP[LRKHYYWIF] entspricht. Wie in der Einleitung erwähnt, wurden in der Arbeit von Livia Otte [61] WW-Domänen des CA150-Proteins untersucht, nicht jedoch die WW2 (FBP28). Daran anknüpfend wurde für diese Arbeit zunächst der prolinreiche Teil aus dem Formin (AS 629-AS 780) bezüglich einer spezifischen Bindung zur FBP28-D15N untersucht.

Sequenz des Formins, prolinreicher Teil in rot:

```
MEEVGNLSLSS RDVLEPKSE AGLEMAQSIL SKFSMKSFLG FTNKLDSLEP EEEDAVLKAF
RSLEGDPAPE RGDPSKGSQD PQAEAPVPPD LKNDGKSARA ETGSEGSQ GK GRSNTSSPGY
ELSPATVSVD NEEVIWVRGT LVHTTSDSDS EDGDQEAEEE SSLDTQKPTT VVLCEPSQEP
KDRAGDSEEN TDTGNTDDTE LCAEESQRTL PETSSKLELG GDGSHPAEHS PRQDQAAEEG
SQIPPAATDQ TVGALASTVS KREAPEEKPF QLPAFFSGLR VLKKGATAEA GETITEIKPK
DGD LALLKLT QRVQKSLGQG GPQTVKSPGR ATDPKATPTL LEQLSQLLNI DMPRTEQKEA
DPEFHGADEM GYSTDQESHK SPRDAHVQGG QVKARTPETA LEAFKALFIR PPKKGSTADT
SELEALKRKM KHEKESLRAV FERSKSRPAD SPSDPKSPDQ SPTEQDDRTP GRLQAVWPPP
KTKDTEEKVG LKYTEAEYQA AILHLKREHK EEIETLQAQF ELKTFHIRGE HALVTARLEE
AIENLKQOLE KRREGCEEMR DVCISTDDDC SPKAFRNCI QTDRETF LKP CDAESKATRS
SQIVPKKLT I SLTQLSPSKD SKDIHAPFQT REGTSSSSSQ KISPPAPPTP PPLPPPLIPP
PPPLPPGLGP LPPAPPIPPV CPVSPPPPPP PPPPTPVPPS DGPPPPPPPP PPLPNVLALP
NSGGPPPPPP PPPPPGLAP PPPPGLSFGL SSSSSQYPRK PAIEPSCPMK PLYWTRIQIN
```

```
DKSQDAAPTL WDSLEEPHIR DTSEFEYLFS KDTTQKKKP LSEAYEKKNK VKKIILLDG  
KRSQTVGILI SSLHLEMKDI QQAIFTVDDS VVDLETLAAL YENRAQEDEL TKIRKYYETS  
KEEDLKLLDK PEQFLHELAQ IPNFAERAQC IIFRAVFSEG ITSLHRKVEI VTRASKGLLH  
MKSVDILAL ILAFGNMNG GNRTRGQADG YSLEILPKLK DVKSRDNGMN LVDYVVKYYL  
RYDQEAGTD KSVFPLPEPQ DFFLASQVKF EDLLKDLRKL KRQLEAQQQ MKLVCKESPR  
EYLQPFKDKL EEEFFKAKKE HKMEESHLEN AQKSFETTVG YFGMKPKTGE KEVTPSYVFM  
WVFEFCDFK TIWKRESKNI SKERLKMAQA SVSKLTSEKK VETKKINPTA SLKERLRQKE
```

Der prolinreiche Bereich wurde mit einem Pepscan (siehe Definitionen im Abschnitt 2.2) durchmustert. Dabei wird eine Peptidsequenz mittels Verschieben um eine bestimmte Peptidlänge (hier 15mere) mit einer bestimmten Verschiebungsrate (hier eine AS) abgetastet. Der Pepscan wurde mit der FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne inkubiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass nahezu alle prolinhaltigen Peptide die Domäne gebunden haben. Es ist kein Schlüsselmotiv (bindungsspezifisch konservierte Reste) für die Bindung erkennbar.

In der Arbeit von Otte et al. [61] wurden 42 WW-Domänen auf ihre Bindungsspezifität hin untersucht und in Bindungsklassen eingeteilt. Anhand dieser Bindungsklassen sollte nun ein spezifisches Bindungsmotiv für die FBP28-D15N WW-Domäne gefunden werden. Dazu wurden Substitutionsanalysen dreier typischer WW-Domänen-Liganden aus der Arbeit von Otte et al. mit der HRP-markierten FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne inkubiert.

Als erstes wurde ein sogenannter L-Ligand (APPTPPPLPP) untersucht (Abbildung 6.7 auf Seite 54). Dessen Sequenz stammt aus dem Formin (AS 646 - 655). WW-Domänen, die einen L-Liganden binden, wechselwirken mit einem PPLP-Motiv, das dieser enthält. Dieses Motiv wird in einer Substitutionsanalyse dadurch erkennbar, dass in diesem Bereich keine Austauschungen gegen andere AS möglich sind. In der Abbildung 6.7 ist zu erkennen, dass das Leucin im PPLP-Motiv durchaus durch andere AS ersetzt werden kann. Die FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne bindet also nicht spezifisch an einen L-Liganden.

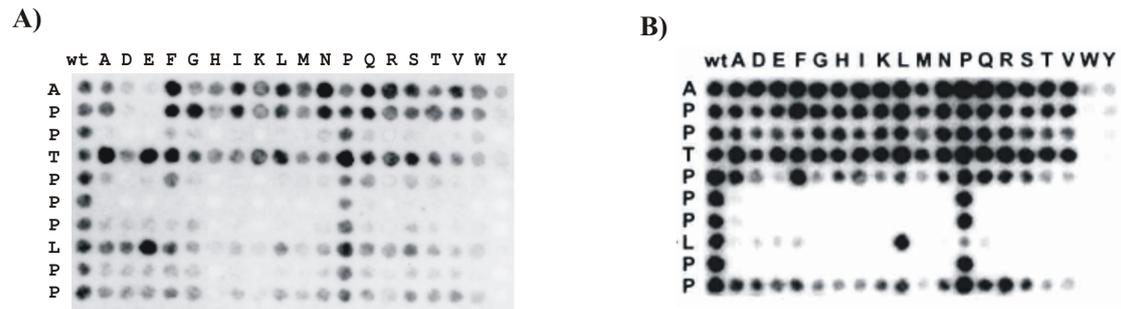


Abbildung 6.7: A) Substitutionsanalyse eines Leucin-Liganden (Motiv PPLP), inkubiert mit der HRP- $C\beta A\beta A$ -FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne. Der Ligand ist aus dem murinen Formin abgeleitet (Swiss-Prot Nummer: Q05859, AS 646 - 655). Das typische PPLP-Motiv [61] kann hier nicht verifiziert werden. Die Position des Leucins ist sehr variabel und damit keine Schlüsselposition. Die Domäne bindet keinen Ligand, der der L-Gruppe zugehörig ist.

B) Beispiel für eine WW-Domäne (*h*FBP11-1) aus der L-Gruppe (Bild aus der Arbeit von Otte et al. [61]). Das PPLP-Motiv ist deutlich zu erkennen.

Die zweite Untersuchung betraf einen typischen R-Liganden (PPGPPPRGPPP). Diese Sequenz stammt aus dem WW-bindenden Protein *h*Npw38BP (AS 479 - 490). Auch hier wurde eine Substitutionsanalyse mit der HRP-markierten Domäne inkubiert.

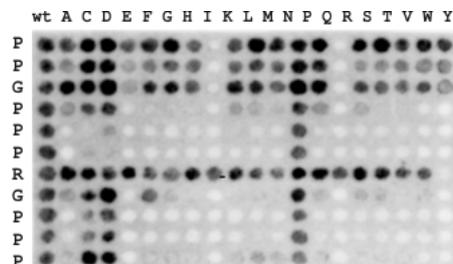


Abbildung 6.8: Substitutionsanalyse eines Arginin-Liganden, inkubiert mit der HRP- $C\beta A\beta A$ -FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne. Der Ligand ist Teil des WW-bindenden Proteins *h*Npw38BP (Swiss-Prot Nummer: Q9Y2W2, AS 479 - 490 [119]). Das typische Arginin im Prolinliganden ist keine Schlüsselaminosäure und damit bindet die Domäne kein Peptid, das den R-Liganden zugehörig ist.

h = human

In Abbildung 6.8 ist zu sehen, dass das Arginin, das wichtig für die Bindung eines prolinreichen R-Liganden ist, bis auf das Tyrosin komplett ausgetauscht werden kann.

Damit ist dies keine Schlüsselposition und somit bindet die Domäne auch nicht spezifisch an einen R-Liganden.

Abschließend wurde eine Substitutionsanalyse eines Poly-P-Liganden (PPPLIPPPPP-LPP) aus dem Formin (AS 645 - 666) getestet. Das Schlüsselmotiv PPPPP, welches typisch für die Gruppe der Polyprolinbinder ist, ist in Abbildung 6.9 deutlich erkennbar. Somit wird die FBP28-D15N WW-Domäne der Poly-P-Gruppe nach Otte et al. [61] zugeordnet.

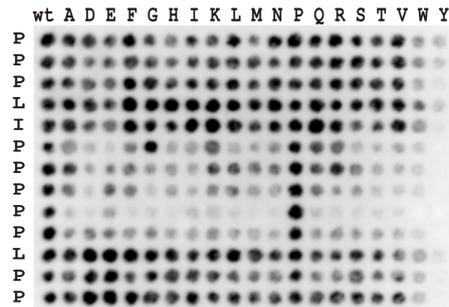


Abbildung 6.9: Substitutionsanalyse eines Polyprolin-Liganden (Motiv PPPPP), inkubiert mit der HRP-C β A β A-FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne. Der Ligand ist aus dem murinen Formin abgeleitet (Swiss-Prot Nummer: Q05859, AS 645 - 666). Als Schlüsselmotiv kann hier PPPPP identifiziert werden.

Eine Längenanalyse des Poly-P-Liganden (Abbildung 6.10 auf Seite 56) zeigt, inwieweit eine Kürzung des Poly-P-Liganden möglich ist, ohne dass die Bindung verloren geht. Aus dieser ergibt sich, dass die Sequenz Nr. 26 (IPPPPL) die kürzeste Sequenz ist, an welche die Domäne gut bindet. Das Schlüsselmotiv PPPPP alleine (Nr. 37 in Abbildung 6.10) reicht nicht aus, um eine Bindung zu gewährleisten. Das Motiv muß vielmehr an beiden Termini von anderen AS flankiert werden (hier Isoleucin und Leucin), um die Bindung zu stabilisieren.

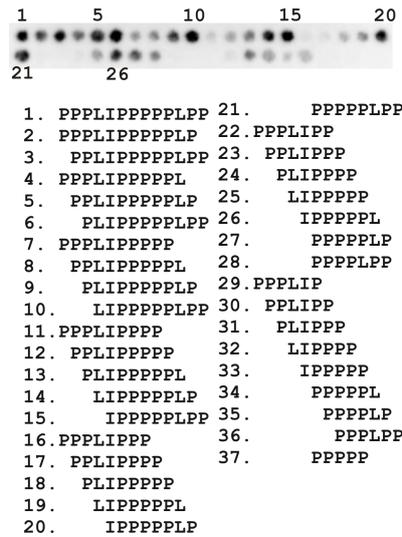


Abbildung 6.10: Längenanalyse des Polyprolin-Liganden PPPLIPPPPLPP, inkubiert mit der HRP-C β A β A-FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne. Die kürzeste Sequenz, welche die Domäne noch gut bindet, ist Nr. 26 (IPPPPL).

Um die Umkehrbarkeit der Erkennung von FBP28-D15N WW-Domäne und Ligand auf der Membran zu testen, wurde die Domäne (4-34) über ein Cystein mit verschiedenen Konzentrationen (100 μ M - 500 nM) auf eine maleimidofunktionalisierte Membran gebracht (siehe Seite 39). Mit dieser Konzentrationsreihe konnte zudem auch die Affinität des Liganden getestet werden, da nach der Standardspotsynthese eine Konzentration der aufzubringenden Lösung (hier wäre es die Domäne) mit 0,3 M höher ist. Der aus der Längenanalyse ermittelte Ligand IPPPPPL wurde über ein Cystein HRP-markiert und inkubiert (Abbildung 6.11).

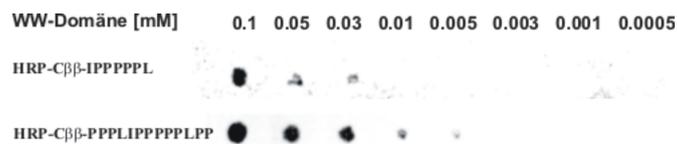


Abbildung 6.11: Versuche mit verschiedenen Konzentrationen der FBP28-D15N (4-34) auf der Membran, inkubiert mit zwei Liganden (HRP-C β A β AIPPPPL und HRP-C β A β A PPPLIPPPPLPP). Mit dem kürzeren Liganden konnte eine Detektion nur bis 100 μ M Domäne erfolgen, mit dem längeren Liganden bis zu 10 μ M Domäne.

Eine Erkennung der Domäne auf der Membran durch den Liganden (so wie es später bei der Substitutionsanalyse sein soll) findet statt. Eine gute Detektion der Bindung

ist mit dem Liganden IPPPPPL bis zu dem Spot möglich, dessen Domäne mit einer Konzentration von 100 μM auf die Membran gebracht wurde. Um die Empfindlichkeit der Erkennung zu steigern, wurde der ursprüngliche, längere Polyprolinligand PPPLIPPPPLPP auf die gleiche Weise getestet (Abbildung 6.11) und es konnte eine Detektion bis zu dem Spot erreicht werden, bei dem mit einer Konzentration von 10 μM der Domäne gearbeitet wurde. Diese Verbesserung läßt sich auf Aviditätseffekte (Avidität = Summe der Affinitäten) zurückführen [139].

6.4 Komplette Substitutionanalyse der FBP28-D15N WW-Domäne

6.4.1 Visualisierung der ligandenbindenden Domänen-Varianten

Nachdem die SPOT-Synthese der FBP28-D15N WW-Domäne auf der Membran erfolgreich angepasst und ein spezifischer Ligand ermittelt wurde, konnte eine komplette Substitutionsanalyse der Domäne nach dem modifizierten Standardprotokoll der SPOT-Synthese [103] durchgeführt werden. Dabei wurden alle Positionen der Domänensequenz gegen alle natürlichen AS ausgetauscht (siehe Definition der Substitutionsanalyse, Seite 13). Diese Substitutionsanalyse der Domäne mit der Länge 4-34 wurde zunächst mit dem HRP-markiertem Liganden $C\beta A\beta A$ -IPPPPL inkubiert. Überraschenderweise konnte dabei keine Bindung detektiert werden. Der Grund dafür lag möglicherweise in einer zu geringen Konzentration der Domäne und ihrer Varianten auf der Membran, für die der Ligand nicht affin genug war. Eine Erhöhung der Affinität wurde in dieser Arbeit bereits mit dem längeren Liganden PPPLIPPPPLPP (siehe Seite 56) gezeigt. Eine Inkubation mit diesem Liganden (HRP-markiert) ergab folgendes Bild (Abbildung 6.12) :

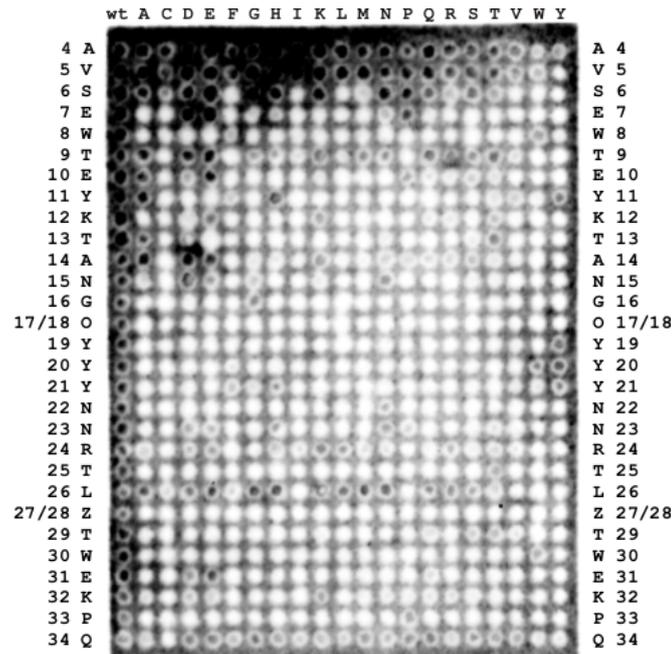


Abbildung 6.12: Komplette Substitutionsanalyse der FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne, inkubiert mit dem Polyprolinliganden HRP-C β A β A-PPPLIPPPPLPP.

O = Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH für K17T18, Z = Fmoc-Glu(OtBu)-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH für E27S28

Jeder schwarze Spot repräsentiert eine Domänenvariante, die den markierten Liganden HRP-C β β -PPPLIPPPPLPP gebunden hat.

Die Wechselwirkungen des Liganden mit der Bibliothek der FBP-D15N (4-34) WW-Domäne und ihrer Varianten zeigten, wie in Abbildung 6.12 zu sehen ist, ein Muster, das aufgrund der schlechten Auflösung nur schwer interpretierbar war. Um dies zu verbessern, wurde die Avidität durch Verdopplung der Sequenz [139] erhöht. Diese Strategie wurde bereits in früheren Arbeiten [119] erfolgreich angewandt. In dieser Arbeit wurde der Ligand PPPLIPPPPLPP zu PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP verdoppelt, über ein Cystein HRP-markiert und damit die Substitutionsanalyse der FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne inkubiert (Abbildung 6.13 A).

Da die verkürzte Variante der Domäne (4-34) im Vergleich zu den längeren Varianten 4-37 ($T_m = 60$ °C) und 1-37 ($T_m = 58$ °C) einen eher geringen Schmelzpunkt von 48 °C aufweist, stellte sich die Frage nach dem Einfluß der terminalen AS zum Bindungsmuster. Zudem ist aus Abbildung 6.13 A zu erkennen, dass der C-Terminus kaum flankierende und damit auch stabilisierende AS besitzt. Nguyen et al. [140] beschreiben, dass

Leu36 nicht unwesentlich zur Stabilität der Domäne beiträgt. Daher wurde eine weitere Substitutionsanalyse, nun aber von der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne, synthetisiert und in gleicher Weise inkubiert (Abbildung 6.13 B).

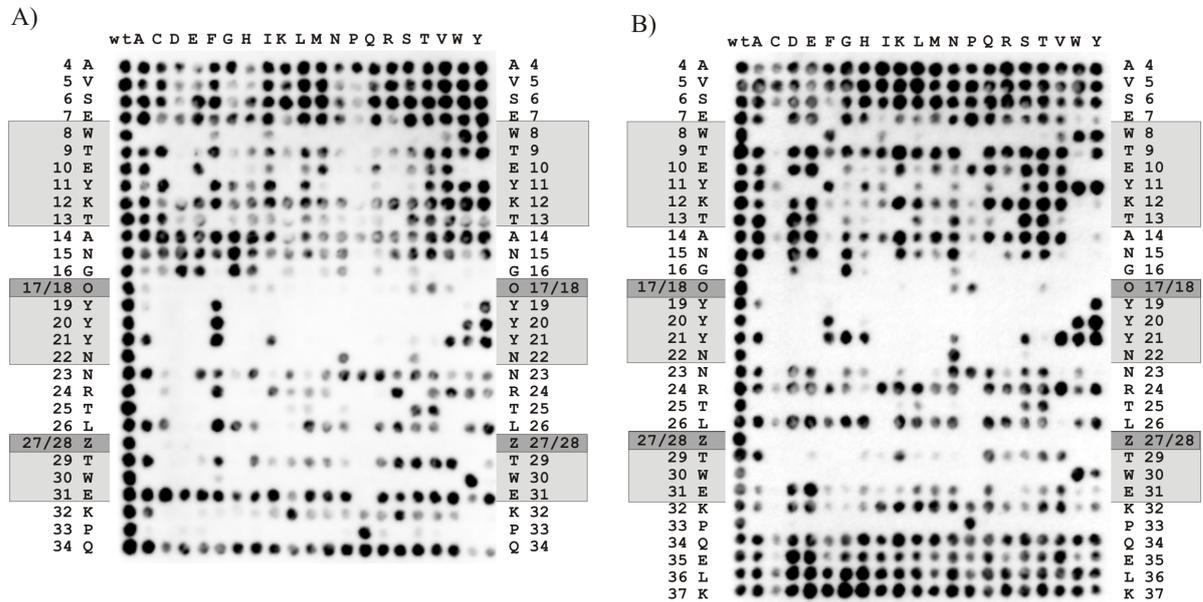


Abbildung 6.13: Komplett Substitutionsanalyse A) FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne und B) der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne, inkubiert mit dem Polyprolinliganden HRP-C β A β A -PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP. Die hellgrauen Bereiche kennzeichnen die Stränge des β -Faltblattes [55], die dunkelgrauen die der Pseudoproline (O = Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{Me,Me}_{pro}$)-OH für die Positionen K17T18; Z = Fmoc-Glu(OtBu)-Ser($\Psi^{Me,Me}_{pro}$)-OH für die Positionen E27S28. Jeder schwarze Spot repräsentiert eine Domänenvariante, die den markierten Liganden HRP-C β A β A -PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP gebunden hat.

Da für die erfolgreiche Synthese der FBP28 WW-Domäne auf der Membran der Einsatz von Pseudoprolinen unerlässlich war, ergab sich ein weiteres Problem. An den Positionen der Pseudoproline ging die Information über die Austausch verloren. Da die Pseudoprolinbausteine Dipeptide sind und im Rahmen der kompletten Substitutionsanalyse nur durch eine AS ausgetauscht wurden, erhielt man Deletionen (Auslassungen) und damit eine Verkürzung der Domänenvarianten. Um die fehlende Information zu bekommen, müssen die Pseudoproline entweder weggelassen (dies ist aber wegen der nötigen Synthesemodifikationen nicht möglich) oder verschoben werden. Dafür mussten passende Positionen ermittelt werden. Diese sollten in der Nähe der

Schleifen sein und Serin, Threonin oder Cystein enthalten (siehe Abschnitt 3.8). Das KT-Pseudoprolin von Position 17/18 konnte nach Position 12/13 verschoben werden. Im dritten Strang bot sich nur die Position R24T25 zum Verschieben des Pseudoprolins der Position E27S28 an (Abbildung 6.14). Da aber ein RT-Pseudoprolin nicht kommerziell erhältlich war, wurde als Ersatz das KT-Pseudoprolin verwendet. Dies war aus zwei Gründen möglich. Zum einen sind sich Arginin und Lysin physikochemisch und damit auch in ihrem Verhalten in Peptiden oder Proteinen ähnlich. Somit können sie in vielen Substitutionsanalysen gegeneinander ausgetauscht werden, ohne dass Information verloren geht. Zum zweiten war in der Substitutionsanalyse (Abbildung 6.13 B) für Position R24 eine gewisse Flexibilität, was die Möglichkeiten der Austausche betrifft, zu erkennen. Bis auf Prolin konnten alle AS substituiert werden, wenn auch mit unterschiedlichen resultieren Bindungsaffinitäten der entsprechenden Mutanten. Mit der chemischen Ähnlichkeit von Arginin und Lysin sowie der Flexibilität in der Position 24, war es möglich, das KT-Pseudoprolin statt des RT-Pseudoprolins zu verwenden.

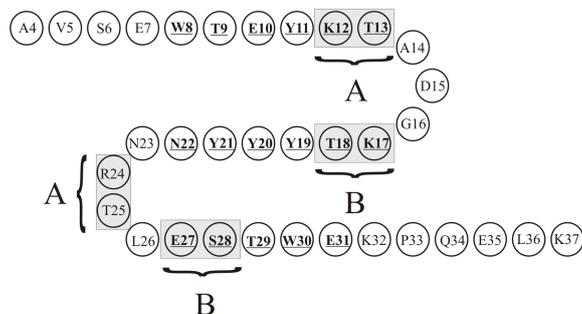


Abbildung 6.14: Möglichkeiten zum Einsatz der Pseudoproline. Diesen werden immer an zwei Stellen für eine Synthese verwendet.

- A)** Für K12T13 und R24T25 wird Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH eingesetzt.
- B)** Für K17T18 wird Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH und für E27S28 wird Fmoc-Glu(OtBu)-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH eingesetzt.

Unter diesen Voraussetzungen wurden erneut zwei Substitutionsanalysen der FBP28-D15N (4-34) und (4-37) WW-Domäne mit Pseudoprolin (Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH an den Positionen K12T13 und K24T25 synthetisiert. Die Substitutionsanalysen wurden, wie beschrieben, synthetisiert und mit HRP-markiertem $C\beta A\beta A$ -PPPLI-PPPPPLPPPPPLIPPPPLPP inkubiert, was zum in Abbildung 6.15 dargestellten Ergebnis führte:

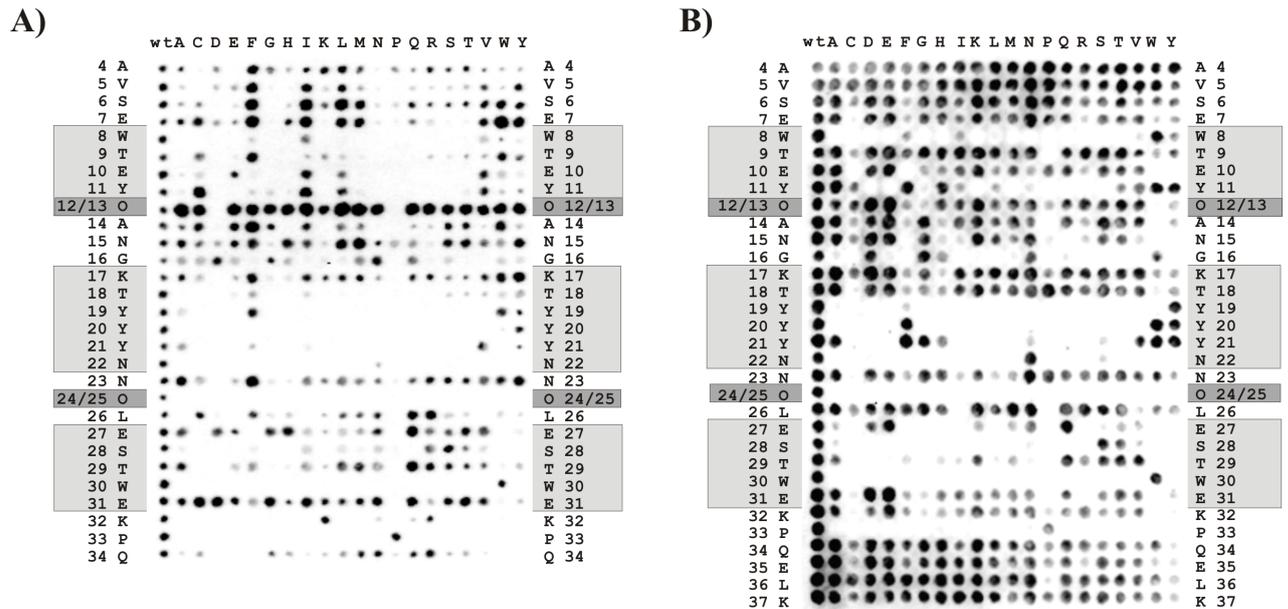


Abbildung 6.15: Komplette Substitutionsanalyse A) FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne und B) der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne, inkubiert mit dem Polyprolinliganden HRP-C β A β A -PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP. Die hellgrauen Bereiche kennzeichnen die Stränge des β -Faltblattes [55], die dunkelgrauen die der Pseudoprolin (O = Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{Me,Me}_{pro}$)-OH für die Positionen K12T13 und R24T25). Jeder schwarze Spot repräsentiert eine Domänenvariante, die den markierten Liganden HRP-C β A β A -PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP gebunden hat. Substitutionsanalysen der FBP28-D15N WW-Domänen.

Ein erster Vergleich der vier Substitutionsanalysen in den Abbildungen 6.13 und 6.15 zeigt, dass sich die Muster der verschiedenen langen Domänen ähneln. In Abbildung 6.15 A) wird deutlich, dass die Spots hier schwächer erscheinen, was auf eine schlechtere Bindung des Polyprolinliganden schließen lässt. Dies kann darin begründet sein, dass die Substitutionsanalyse 6.15 A) an Position 24/25 die Kombination KT aufweist. Abgleich mit Substitutionsanalyse 6.13 A) zeigt für die R/K-Substitution deutlich geringere Signalintensitäten. In den entsprechenden Substitutionsanalysen der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne (Bild B in Abbildung 6.13 und 6.15) wird der Unterschied der beiden offensichtlich durch die flankierenden AS kompensiert. Weiterhin gilt für alle Substitutionsanalysen, dass ein Austausch gegen Prolin in den Bereichen des Faltblattes weniger bevorzugt ist, was aus seiner Funktion als Faltblattbrecher herrührt. Der N-Terminus (Ala4-Glu7) und der C-Terminus (Gln34 in den Bildern A der Abbildungen 6.13 und 6.15 und Gln34-Lys37 in den Bildern B der Abbildungen 6.13 und 6.15) sind

sehr variabel bezüglich der Austausch, da sich beide Bereiche außerhalb des Faltblattes befinden. Die Bereiche der Schleifen (Ala14-Gly16 und Asn23-Leu26) zeichnen sich dadurch aus, dass sie je eine invariable Position enthalten (Gly16 und Thr25), wohingegen die anderen eine große Austauschvariabilität besitzen, ohne dass ihre Bindung zum Liganden verloren geht. In der Region des Faltblattes (in Abbildung 6.13 und 6.15 hellgrau markiert) fallen im zweiten Strang die invariablen Tyrosine (19-21) auf, im ersten und dritten Strang die Tryptophane (Trp8 und Trp30). Zusätzlich sollten noch zwei Positionen hervorgehoben werden, die völlig invariant gegenüber Austauschen sind: Asn22 und Pro33.

6.4.2 Visuelle Auswertung der Substitutionsanalyse der FBP28-D15N WW-Domäne - Die Variabilität

Für eine einfache Auswertung zur Bestimmung der Schlüsselaminosäuren in der Sequenz der FBP28-D15N WW-Domäne wurde der Begriff der Variabilität (V) eingeführt. Diese verdeutlicht die Austauschbarkeit der einzelnen Positionen der FBP28-D15N WW-Domäne gegen andere natürliche AS, ohne dass die Bindung zum Liganden verloren geht. Hierbei wurden die positiven Signale (Bestimmung wie auf Seite 40 beschrieben.) in der Substitutionsanalyse für jede Position gezählt. Die Variabilität V berechnet sich folgendermaßen:

$$V = \text{Anzahl der positiven Signale} \times 100 \% / 20 \text{ natürliche AS}$$

Austauschbarkeit einer Position gegen alle 20 natürlichen AS entspricht daher einer 100%igen Variabilität dieser Positionen gegen Austausche. Sie sind damit scheinbar nicht wesentlich für Bindung zum Liganden und für die Stabilität. Sie können jedoch beispielsweise in einer Domäne als flankierende AS stabilisierend wirken. Eine Position, die entweder überhaupt nicht oder eventuell gegen ein oder zwei weitere AS ausgetauscht werden kann, könnte eine Schlüsselposition und damit für die Stabilität, Faltung und/oder Bindung der Domäne an den Liganden essenziell sein.

Aus den vier Substitutionsanalysen (siehe Abbildung 6.13 und 6.15) kann mit der Bestimmung der positiven Signale die Variabilität der einzelnen Positionen der FBP28-D15N WW-Domäne gemittelt werden, was folgendes Bild eines Variabilitätsdiagramms veranschaulicht:

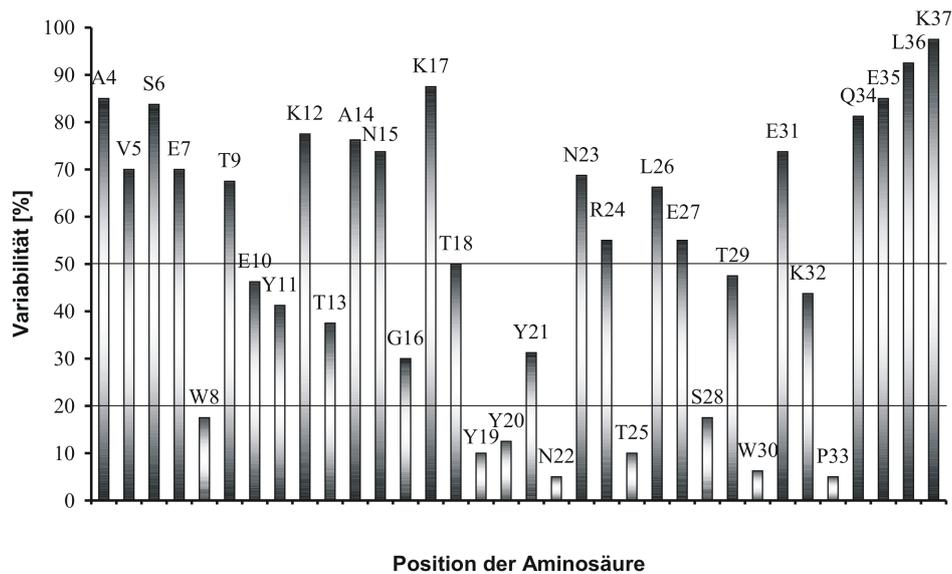


Abbildung 6.16: Variabilitätsdiagramm

Alle Spots aus den Substitutionsanalysen der FBP28-D15N WW-Domänen (Abbildung 6.13) wurden quantitativ vermessen [111] und die für positiv befundenen Spots wurden über die vier Datenfelder ausgezählt, gemittelt und ins Verhältniss zu 100 % gesetzt. Wenige positive Spots bedeuten eine geringe Variabilität gegenüber Austausch an dieser Position. Es wurden drei Bereiche der Variabilität (V) definiert. $V \leq 20\%$ kennzeichnet niedrige Variabilität, mittlere Variabilität ist im Bereich $50 \geq V \geq 20\%$ und hohe Variabilität wird im Bereich $V \geq 50\%$ angesiedelt.

Es wurden drei Bereiche der Variabilität (V) definiert. $V \leq 20\%$ kennzeichnet niedrige Variabilität, mittlere Variabilität liegt im Bereich $50\% \geq V \geq 20\%$ und hohe Variabilität wird im Bereich $V \geq 50\%$ angesiedelt. Damit ließ sich die Substitutionsanalyse gut interpretieren und auswerten. Diesen Grenzwerten liegen Erfahrungswerte der Arbeitsgruppe "Molekulare Bibliotheken" der Charité zugrunde. Hierfür waren zahlreiche SPOT-synthetisierte Substitutionsanalysen ausgewertet worden.

In den Substitutionsanalysen der FBP28-D15N WW-Domäne kann man Trp8, Tyr19, Tyr20, Asn22, Thr25, Ser28, Trp30 und Pro33 dem Bereich der niedrigen Variabilität ($\leq 20\%$) zuordnen (siehe Abbildung 6.16). Ein Austausch an diesen Stellen hat einen kompletten Verlust der Bindung zum Liganden der entsprechenden WW-Domänen-Varianten zur Folge. Die Positionen Asn22, Trp30 und Pro33 sind absolut invariant ($V = 5\%$). Die anderen Positionen können nur gegen physikochemisch sehr ähnliche AS

ausgetauscht werden (Abbildung 6.17).

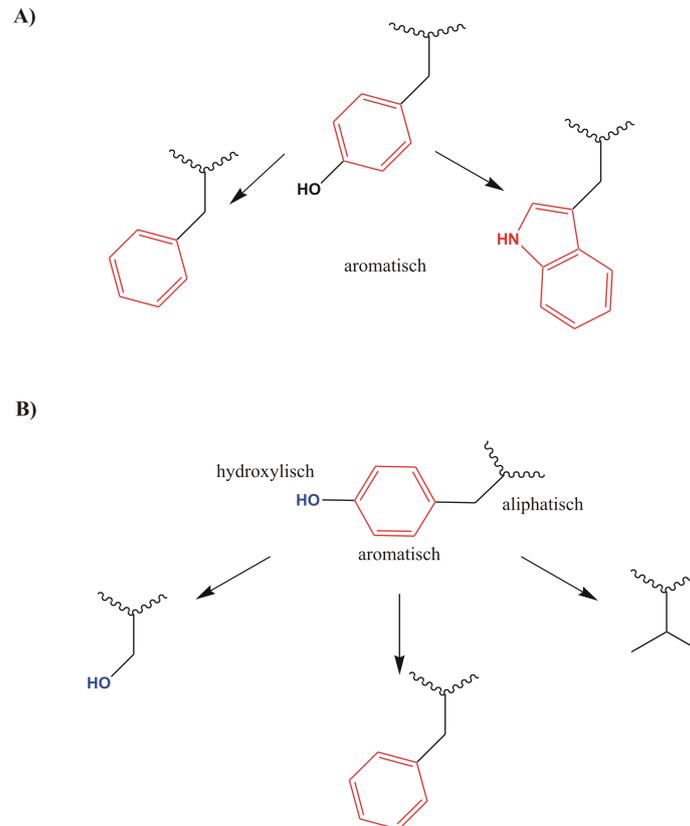


Abbildung 6.17: Zusammenhang zwischen physikochemischer Ähnlichkeit und Variabilität gegenüber Austauschen bei Substitutionsanalysen

A) Eine ausschließlich hohe physikochemische Ähnlichkeit zwischen den ausgetauschten Seitenketten ($V \leq 20\%$) kennzeichnet niedrige Variabilität.

B) Eine erweiterte physikochemische Ähnlichkeit zwischen den ausgetauschten Seitenketten kennzeichnet den Bereich der mittleren Variabilität ($50\% \geq V \geq 20\%$). Das bedeutet, dass Teileigenschaften der ursprünglichen Seitenkette die Gesamteigenschaften der ausgetauschten Seitenkette kennzeichnen.

Dabei ist genau eine chemische Eigenschaft entscheidend für die Möglichkeit eines Austausches ohne Verlust der Bindung zum Liganden. Zum Beispiel kann man das Thr25 (10%), welches eine aliphatische Hydroxylgruppe trägt, nur gegen Serin, welches auch eine aliphatische Hydroxylgruppe trägt, austauschen. Dagegen wird ein Austausch gegen Tyrosin bei dieser geringen Variabilität nicht bevorzugt, da es eine aromatische Hydroxylgruppe enthält. Die Aromaten Trp8 ($V = 17,5\%$), Tyr19 ($V = 10\%$) und

Tyr20 ($V = 12,5\%$) sind nur gegen andere Aromaten austauschbar.

Betrachtet man die Bereiche der mittleren Variabilität (Glu10, Tyr11, Thr13, Gly16, Tyr21, Thr29 und Lys32), so sind diese gekennzeichnet durch eine erweiterte physikochemische Ähnlichkeit der Seitengruppen der auszutauschenden AS. Dies bedeutet, dass mehr als nur genau eine chemische Eigenschaft vorhanden ist, bei deren Austausch die Bindung zum Liganden nicht verloren geht. Gerade große Seitenketten der AS vereinen mehrere chemische Attribute: die Methylenkette das Aliphatische und die funktionelle Gruppe entsprechende Eigenschaften (basisch, sauer, aromatisch usw.). Beispielsweise kann die Hydrophobizität in AS-Seitenketten aus zwei Gruppeneigenschaften zusammengesetzt sein, aus aliphatischer und aromatischer Hydrophobizität. Tyr21 ($V = 31,25\%$) kann nicht nur gegen Aromaten, sondern auch gegen aliphatische Reste, wie Alanin, Valin oder Glycin ersetzt werden. Diese entsprechen der β -Methylengruppe des Tyrosins. Solche erweiterten Austausche sieht man auch bei Tyr11 ($V = 41,25\%$, aromatisch/aliphatisch) und Thr13 ($V = 37,5\%$, hydroxy-aliphatisch/aliphatisch/sauer). Je näher man der Grenze $V = 50\%$ kommt (zB. Glu10, Thr29 oder Lys32), desto größer wird die Gruppe der einsetzbaren AS. Thr29 ($V = 50\%$) ist zB. gegen das chemisch nah verwandte Serin, aber auch gegen die Aliphaten Alanin, Leucin und Valin, sogar gegen Aromaten (Phenylalanin und Histidin) und gegen die Basen Lysin und Arginin und letztlich gegen Glutamin und Methionin austauschbar. Über der Grenze von $V = 50\%$ lassen sich kaum noch konkrete chemische Eigenschaften erkennen und zusammenfassen.

Ein Variabilitätsdiagramm ist damit nicht nur ein Maß für Variabilität der Bindungsaffinität eines Liganden in verschiedenen Positionen, sondern auch ein Maß für die physikochemische Ähnlichkeit der AS, die ohne Verlust der Bindung ausgetauscht werden können. Aus diesen Beispielen kann man einen Zusammenhang zwischen Bindungsverhalten und Variabilität aufstellen. Mit steigender Variabilität sinkt der Einfluss der AS-Seitenketten auf die biologische Funktion eines Proteins.

6.4.3 Längenanalyse der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne

Neben der Substitutionsanalyse wurde auch eine Längenanalyse der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne durchgeführt. Dies bedeutet ein Verkürzen der zu untersuchenden Sequenz vom N-Terminus und/oder C-Terminus bis zu einer vorher festgelegten Länge. Damit kann festgestellt werden, bis zu welcher Länge der entsprechenden Domäne eine Bindung zu detektieren. Abbildung 6.18 zeigt, dass die Domäne N-terminal min-

destens ab Position Trp8 und C-terminal mindestens bis zur Position Pro33 vorhanden sein muss, damit die Bindung des Liganden nicht verloren geht.



Abbildung 6.18: Längenanalyse der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne, inkubiert mit dem Polyprolinliganden HRP-CβAβA - PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP. Jeder schwarze Spot repräsentiert eine Domänenvariante, die den markierten Liganden gebunden hat. Kontrollen: a = FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne; b = FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne um ein β-Alanin verlängert; c = FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne umgekehrt synthetisiert; d = randomisierte Sequenz der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne. Rotmarkierte Sequenzbereiche zeigen die maximale Möglichkeit der Verkürzung der Domäne ohne Verlust der Bindung zum Liganden. O = Fmoc-Lys(Boc)-Thr(Ψ^{Me,Me}pro)-OH, Z = Fmoc-Glu(OtBu)-Ser(Ψ^{Me,Me}pro)-OH.

6.4.4 Einzelbetrachtungen bestimmter Bereiche der Substitutionsanalyse in Hinblick auf Ligandenbindung und Rückschlüsse auf die Stabilität der Domäne

Im Folgendem sollen einzelne Bereiche der Sequenz der FBP28-D15N WW-Domäne mittels der Substitutionsanalyse genauer betrachtet werden. Wie bei Macias et al. [55] beschrieben ist, bilden die AS Trp8, Tyr20 und Pro33 einen hydrophoben Cluster auf der konvexen Seite der Domäne (blaue Seitenketten, siehe Abbildung 6.19).

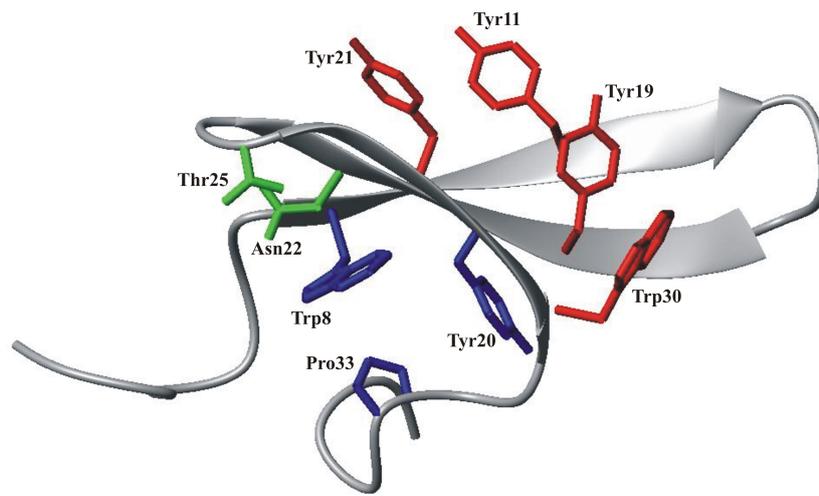


Abbildung 6.19: NMR-Struktur des wt der FBP28 WW-Domäne [55] (PDB: 1E0L).
Rot - hydrophober Cluster auf der konkaven Seite, Ligandenbindungsseite
Blau - hydrophober Cluster auf der konvexen Seite, wichtig für die Stabilität der Domäne
Grün - entscheidende Positionen für die Stabilität der Domäne in der zweiten Schleife

Diese AS gehören auch in den Bereich der Positionen mit niedriger Variabilität. Ein Austausch in diesen Positionen führt zu einem kompletten Verlust der Bindung zum Liganden der FBP28-D15N WW-Domäne. Die Positionen Tyr19, Tyr21 und Trp30 bilden einen hydrophoben Cluster auf der konkaven Seite der Domäne und werden als Ligand-Bindungs-Stelle gesehen (rote Seitenketten, siehe Abbildung 6.19). Diese Aussage stützt sich auf die Tatsache, dass Sequenzvergleiche mit anderen WW-Domänen (zum Beispiel *hYAP65* WW-Domäne) anhand der Homologie der WW-Domänen und

deren Bindungstaschen gezogen werden können [43]. Eine Strukturbeschreibung der FBP28 WW-Domäne im Komplex mit einem Liganden gibt es bis jetzt noch nicht.

In der Literatur wird beschrieben, dass die Positionen Tyr19 und Tyr21 zur Ligandenbindung [55, 141] beitragen und Tyr19 weiterhin durch die Bildung eines hydrophoben Clusters aus Tyr11, Tyr19 und Trp30 die Domäne auf der konkaven Seite [140] stabilisiert. Dies wird durch die gefundene geringe Variabilität des Tyr19 ($V = 10\%$) ersichtlich. Im Gegensatz dazu ist das Tyr21 nicht so stark konserviert ($V = 32\%$). Daher kann postuliert werden, dass Tyr21 die Ligandenbindung eher stabilisiert, und nicht direkt daran beteiligt ist. Tyr19 ist dagegen durch die Doppelaufgabe (Bindung und Stabilisierung) nicht austauschbar, was auch in den Substitutionsanalysen bestätigt wurde (Abbildung 6.13 und 6.15).

Bei der Betrachtung der Schleifenregionen (Ala14-Gly16 und Asn23-Leu26) fällt auf, dass in jeder dieser Regionen nur je eine gegen Austausch empfindliche Position (Gly16, Thr25) gefunden wird, wohingegen die anderen Positionen (Ala14, Asn15 und Asn 23, Thr25, Leu26) flexibel sind. Eine mögliche Erklärung des Phänomens gelingt im Falle des Thr25 durch einen Vergleich mit der Arbeit von Jiang et al. [20]. Die Autoren beschreiben, dass das Asn des zweiten β -Stranges mit dem Asp der zweiten Schleife der *hYAP65* WW-Domäne mittels zweier Wasserstoffbrücken interagiert. Durch Austausch des Asp gegen ein Thr fanden die Autoren, dass eine Steigerung der Stabilität der *hYAP65* WW-Domäne erreicht wurde. Dies wurde damit erklärt, dass nur eine Wasserstoffbrücke als Wechselwirkung vom Asn zum Thr möglich war und damit vom Asn des zweiten β -Stranges eine zweite Wasserstoffbrücke stabilisierend zum ersten β -Strang weisen konnte. In Analogie wird ein ähnliches Verhalten für die FBP28-D15N WW-Domäne angenommen (Abbildung 6.19). Das Thr25 der zweiten Schleife ($V = 10\%$) wechselwirkt in gleicher Weise mit dem Asn22 ($V = 5\%$) des zweiten β -Stranges. Auch hier kann eine zweite Wasserstoffbrücke hin zum ersten Strang die Domäne stabilisieren. Die geringe Variabilität der AS Asn22 und Thr25 unterstützen diese Hypothese. Für Gly16 konnte in der Literatur keine ähnliche Untersuchung gefunden werden, die eine Erklärung zulässt.

Interessanterweise kann eine Deletion (Auslassung) in der Domäne vorgenommen werden, ohne dass die Bindung zum Liganden verloren geht. Dies ist in Abbildung 6.15 im Bild A) und B) an der Position O12/13 zu sehen. An dieser Position wird, wie beschrieben, ein Pseudoprolinbaustein (Dipetidbaustein) eingesetzt. Wird dieser in der Substitutionsanalyse ausgetauscht, so ergibt sich eine Deletion der Mutanten um eine AS. Wie in Abbildung 6.15 (Bild A) und B)) zu sehen ist, sind nahezu alle natürlichen

AS an dieser Stelle erlaubt. Damit zeigt sich, dass der Einfluss der ersten Stranges auf die Ligandenbindung gering ist.

6.5 Grenzen der SPOT-Technik

Nachdem die Substitutionsanalyse ausgewertet wurde, sollen an dieser Stelle die Grenzen der SPOT-Technik zur kritischen Bewertung aufgezeigt werden.

Die SPOT-Synthesetechnik ist ein hochparalleles Verfahren, mit dem sich sehr viele Peptide, oder in diesem Fall Domänen, gleichzeitig herstellen lassen. Dadurch ist es möglich, vergleichend Bindungsstudien an vielen Peptiden oder Domänen durchzuführen. Die dabei gewonnenen Informationen lassen indirekte Rückschlüsse auf strukturelle Charakteristika einer zu untersuchenden Domäne oder eines Peptides zu. Der Vorteil liegt in der Anzahl gleichzeitig synthetisierbarer Peptide (bis zu 6000 Spot pro Membran). Es gibt aber auch Grenzen.

In der SPOT-Synthese ist, wie auch bei jeder anderen chemischen Reaktion, der Umsatz bei jedem Kopplungsschritt in den seltensten Fällen 100 %ig. Daraus folgt die Existenz von Abbruch- oder Fehlsequenzen auf jedem Spot in variablem Umfang. Im Gegensatz zur Synthese am Harz, können die Peptide nach der Synthese nicht gereinigt werden. Bei kurzen Sequenzen (9 oder 12mere) ist die Wahrscheinlichkeit recht groß, dass das gewünschte Peptid in ausreichender Menge vorhanden ist. Für die Untersuchung mit Antikörpern reicht eine geringe Konzentration des Peptids aus, um ein positives Signal bei einer Bindung zu erhalten. Je länger die Peptide aber werden, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit, dass das gewünschte Peptid nicht vollständig synthetisiert wird. Neben der Ausbeute einzelner Kopplungsschritte, kann das aber auch Syntheseproblemen der Sequenz selbst liegen. Daher ist die Länge der mittels SPOT-Technologie synthetisierbaren Peptide begrenzt. Toepert et al. [62] konnten die *hYAP65* WW-Domäne mit einer Länge von 43 AS erfolgreich auf der Membran synthetisieren. Als Standard für SPOT-synthetische Peptidarrays wird daher vorgeschlagen, mindestens zwei bis drei Analysespots einzuplanen und per MS zu analysieren, um daraus Hinweise auf die Synthesegüte zu erhalten (siehe Seite 39).

Was sagen die Bindungsstudien aber aus? Ein positives Signal repräsentiert ein Peptid oder hier eine Domäne, das mit dem verwendeten Liganden interagiert. Daraus lässt sich nicht schließen, ob das Peptid oder die Domäne ohne Ligand gefaltet ist, oder ob die Faltung induziert wurde [62]. Weiße Spots repräsentieren nicht bindende Domä-

nenvarianten. Die Information darüber, ob diese gefaltet sind oder nicht, geht verloren, da über negative Signale keine Aussage getroffen werden kann.

Beim Vergleich der Substitutionsanalysen der langen (4-37) und der kurzen Variante (4-34) der hier untersuchten Domäne (Abbildung 6.13) fällt auf, dass die Muster ähnlich sind. Betrachtet man aber die Schmelzpunkte der unmutierten D15N-Domänen, so sind diese mit 60 °C und 48 °C sehr verschieden. Dieser Unterschied in der Stabilität rührt nicht von den Seitenketten her, da das Verhalten zum Liganden nahezu gleich ist. Die Beiträge des Rückgrates können nicht direkt aus der Substitutionsanalyse abgeleitet werden.

Betrachtet man die Längenanalyse der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne, so erkennt man, dass die hier untersuchte Domäne N-terminal mindestens ab Position Trp8 und C-terminal mindestens bis zur Position Pro33 vorhanden sein muss, bevor die Bindung zum Liganden verloren geht. Dabei kann gleichzeitig keine Aussage über die Stabilität der unterschiedlich langen Domänenvarianten getroffen werden.

Eine Quantifizierung der Dissoziationskonstante anhand der Intensität des Signals eines Spots ist bisher nur begrenzt möglich. Dazu ist es nötig, die Arrays mehrmals zu synthetisieren. Zudem braucht man schon bekannte Dissoziationskonstanten für ähnliche Bindungen (zum Beispiel gleiche Domäne und Peptidligand gleicher Länge), um eine Kalibrierung zu erhalten [142].

Alle diese aufgezeigten Grenzen schmälern aber nicht die Vorteile der SPOT-Synthese. Sie darf nur nicht als absolute Methode angesehen werden. Man erhält einen Überblick über das Bindungsverhalten und kann die Spezifität eines bindenden Peptides schnell eingrenzen. Letztendlich müssen die gewonnenen Daten und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen durch biophysikalische Methoden verfeinert werden.

6.6 Biophysikalische Untersuchung ausgewählter Mutanten aus der Substitutionsanalyse

Zu den biophysikalischen Methoden zur Untersuchung einer Domäne oder eines Peptides allgemein gehört die CD-Spektroskopie zur Bestimmung des Faltungszustandes. WW-Domänen zeigen ein typisches CD-Spektrum eines antiparallelen β -Faltblattes mit einem rotverschobenen Maximum bei 230 nm (Einfluß der Aromaten) [131, 52]. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie lässt sich durch Anlegen eines Temperaturgradienten

auch der Schmelzpunkt bestimmen. Somit erhält man Informationan über die Stabilität einer Domäne oder ihrer Varianten.

Mittels SPR-Spektroskopie wird die Bindungsaffinität dieser gegenüber eines Liganden bestimmt. Alle FBP28-D15N WW-Domänen und ihre Varianten wurden gegen den Polyprolinliganden PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP getestet.

Zunächst wurde der Faltungszustand der unmutierten FBP28-D15N WW-Domänen (4-34) und (4-37) bestimmt. Es konnte ein Maximum bei 230 nm gezeigt werden (Abbildung 6.20). Es wurde eine thermische Entfaltung mittels CD-Spektroskopie verfolgt und ein Schmelzpunkt von 48 °C für die verkürzte Domäne (4-34) und 60 °C für die längere Domäne (4-37) ermittelt. Die CD-Kurven vermitteln gleich stabile Domänen, wohingegen die Schmelzpunkte einen erheblichen Stabilitätsunterschied zeigen. Mittels SPR-Spektroskopie wurde eine Dissoziationskonstante von 427 μM (4-34) und 223 μM (4-37) gemessen. Dies sind die Vergleichswerte für das Bindungsverhalten der FBP28-D15N WW-Domäne. Da die längere Variante (4-37) einen höheren Schmelzpunkt und eine niedrigere K_d hat, wurden alle Mutanten in dieser Länge hergestellt. Damit soll erreicht werden, dass die Unterschiede in Stabilität und Bindungsverhalten zwischen der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne und ihren Mutanten gut meßbar sind.

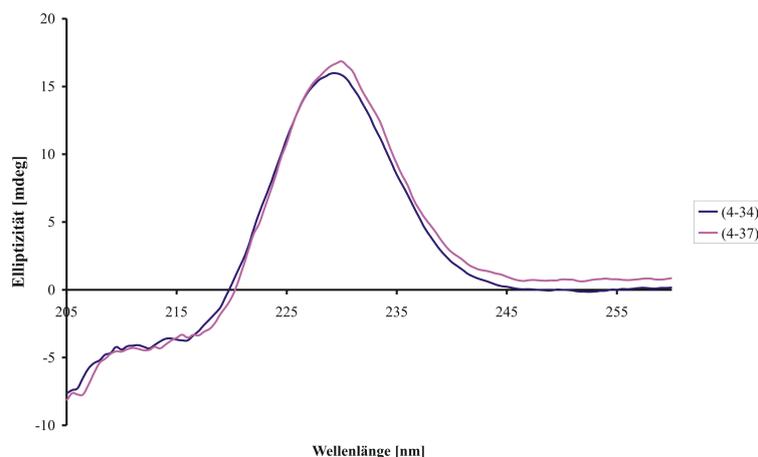


Abbildung 6.20: CD-Spektrum der FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne (blau) und der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne (pink), Das Spektrum zeigt eine typische Kurve für eine WW-Domäne mit einem positiven Maximum bei 230 nm [131, 52].

Positive Signale auf der Membran repräsentieren Domänenvarianten, die den Liganden binden. Das bedeutet wiederum, dass die Domänenvariante korrekt gefaltet ist.

Einzelne Varianten (Binder- und Nichtbinder = WW-Domänenvarianten, die den Polyprolinliganden binden oder nicht) wurden ausgesucht und wie die FBP28-D15N WW-Domänen biophysikalisch untersucht (siehe Tabelle 6.2). Dafür wurden zwei Mutanten aus den hydrophoben Clustern (W8Y - Binder, Y11R - Nichtbinder) und zwei Binder aus anderen Bereichen (T13A, L26S) ausgewählt. Des Weiteren wurden Mutanten aus den Bereichen der Pseudoproline (Nichtbinder - RT(24,25)A, ES(287,28)E; Binder - KT(12,13)E, KT(17,18)P) und dem der zweiten Schleife (Nichtbinder - N22A, T25D) synthetisiert.

Name	Gefaltet?	T _m [°C]	Änderung zu D15N (4-37) in %	K _d [μM]
D15N (4-34)	+	48	-20	427±74
D15N (4-37)	+	60	-	223±60
W8Y	+	17	-72	336±106
Y11R	+	61	+2	n.d.
T13A	+	49	-18	338±81
E31V	+	60	-	292±115
L26S	+	59	-2	534±261
KT(12,13)E	+	32	-47	600±228
RT(24,25)A	-	n.q.		n.q.
ES(27,28)E	-	n.q.		n.q.
KT(17,18)P	+	32	-47	802±53
N22A	(+)	n.q.		n.d.
T25D	(+)	n.q.		n.d.

Tabelle 6.2: 14 synthetisch hergestellte FBP28-D15N WW-Domänenvarianten mit Faltungszustand, Schmelzpunkt T_m und Dissoziationskonstante K_d zum Liganden PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP.

+ = gefaltet, - = nicht gefaltet, (+) = Faltung nicht gut ausgeprägt
n.q. = nicht quantifizierbar, n.d. = nicht determiniert

Zunächst sollen die Positionen der Pseudoproline näher betrachtet werden. Wie wirkt sich die Verkürzung durch Substitution eines Dipeptids durch eine einzelne AS auf die Faltung und damit auf die Bindung aus? Wie im Bild 6.21 zu sehen ist, sind KT(12,13)E und KT(17,18)P Binder des Liganden PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP (grüne Markierung). Somit wird angenommen, dass diese gefaltet vorliegen.

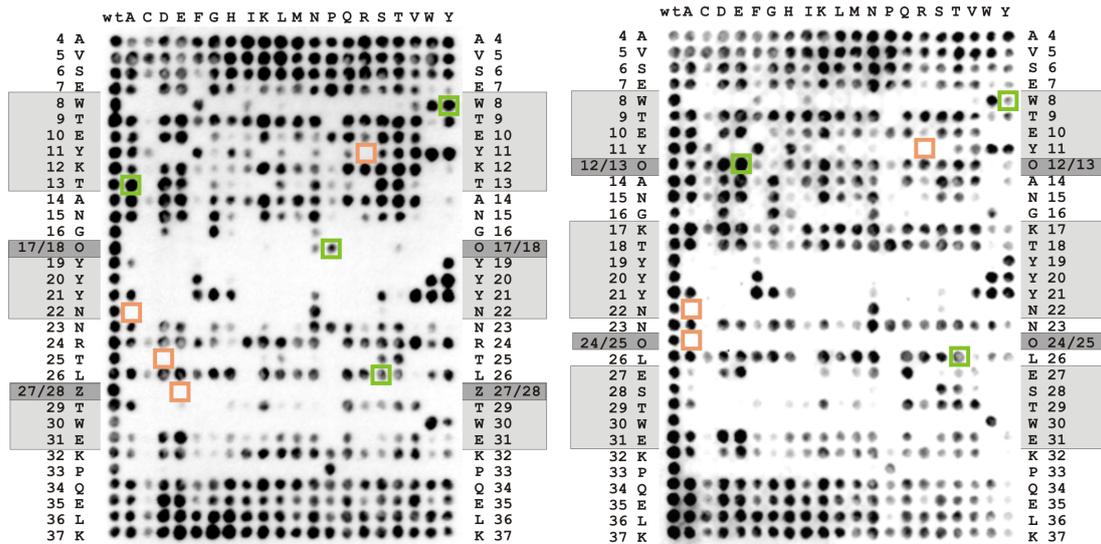


Abbildung 6.21: Zur besseren Orientierung wurden die in Tabelle 6.2 erwähnten Domänenvarianten in den Substitutionsanalysen markiert
orange Markierung: Nichtbindervarianten ES(27,28)E, Y11R, RT(24,25)A
grüne Markierung: Bindervarianten KT(17,18)P, KT(12,13)E

Die CD-spektroskopischen Messungen der Bindervarianten ergaben Kurven eines typischen β -Faltblattes mit einem positiven Maximum bei 230nm (Abbildung 6.22). Zudem wurden auch die Schmelzpunkte als Stabilisationsmerkmal über CD-Spektroskopie ermittelt (siehe Tabelle 6.2). Die verkürzten Varianten RT(24,25)A und ES(27,28)E sind Nichtbinder des Liganden (Abbildung 6.21, orange Markierung) und die CD-Spektroskopie-Kurven zeigen eine Verringerung des Faltungsgrades (Abbildung 6.22). Schmelzpunkte konnten nicht bestimmt werden (siehe Tabelle 6.2). Daraus könnte man vermuten, dass eine den Liganden bindende Mutante gefaltet ist und im Umkehrschluß dies für eine den Liganden nicht bindende Mutante nicht gilt. Die Bindervarianten W8Y, T13A und L26S lassen diese Folgerung auch zu. Betrachtet man aber das CD-Spektrum der Nichtbindervariante Y11R (Abbildung 6.22), so sieht man die typische Kurve eines gefalteten β -Faltblattes. Der Schmelzpunkt von 61 °C zeigt eine stabile WW-Domänenvariante. Obwohl diese den Liganden nicht bindet, ist kein Anzeichen einer Destabilisierung oder sogar Denaturierung zu finden. Dies deckt sich damit, dass man keine Aussage über den Faltungszustand einer Nichtbindervariante einer Domäne auf der Membran treffen kann.

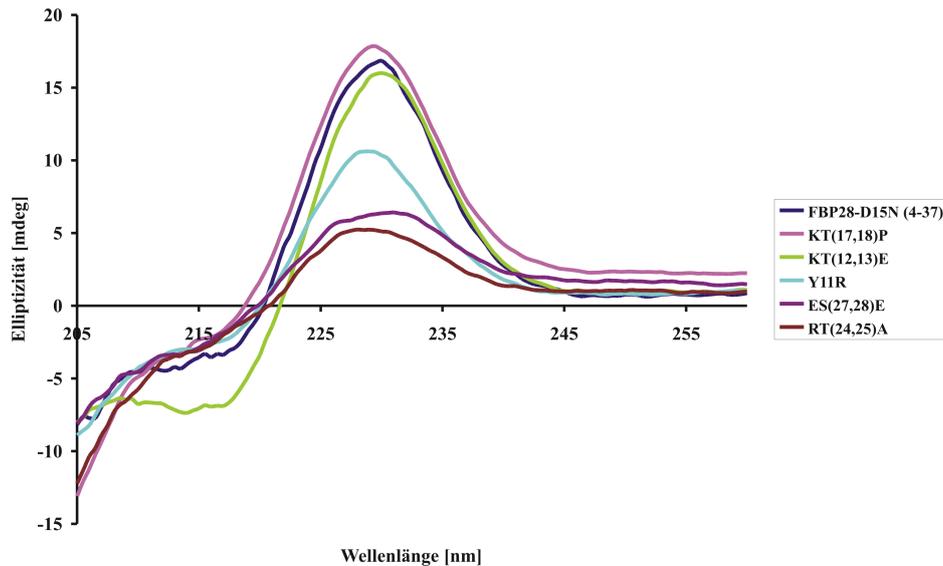


Abbildung 6.22: Faltungsmessungen an FBP28-D15N (4-37) WW-Domänenvarianten mittels CD-Spektroskopie. Der wt, KT(17,18)P, KT(12,13)E und Y11R zeigen eine typische Kurve für ein korrekt gefaltetes β -Faltblatt einer WW-Domäne mit einem Maximum bei 230 nm. Die Varianten ES(27,28)E und RT(24,25)A zeigen bei 230 nm nur eine Elliptizität von 5 mdeg und werden daher als nicht korrekt gefaltet eingestuft.

Zuletzt wurde die Verhältnisse einzelner AS zueinander in der zweiten Schleife untersucht. Es wurde vermutet, dass die Wechselwirkung zwischen den Positionen Thr25 und Asn22 wesentlich zur Stabilität der Domäne beitragen könnten (siehe Seite 68). Das geht aus der Arbeit von Jiang et al. [20] vergleichend zur *hYAP65* WW-Domäne hervor. Die Autoren mutierten das ursprüngliche Asp aus der zweiten Schleife der *hYAP65* WW-Domäne gegen ein Thr, welches mit dem Asn des zweiten β -Stanges wechselwirkt. Durch diese Mutation konnten sie eine Erhöhung der Stabilisierung der *hYAP65* WW-Domäne erreichen. Analog dazu begründet sich die geringe Variabilität des Thr25 (zweite Schleife) und des Asn22 (zweiter β -Stang) der FBP28-D15N WW-Domäne. Hierzu wurden zwei Mutanten hergestellt (T25D und N22A). Die Mutante T25D stellt den umgekehrten Fall zur *hYAP65* WW-Domäne dar, so dass erwartet wird, dass sich die Stabilität verringert. Da angenommen wird, dass Asn22 analog zur *hYAP65* WW-Domäne stabilisierende Wasserstoffbrücken ausbildet, sollte eine Mutation gegen Alanin eine Destabilisierung zur Folge haben. Beide Mutanten zeigen im Vergleich zur FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne eine erheblich weniger ausgeprägte Faltungskurve im CD-Spektrum (Abbildung 6.23).

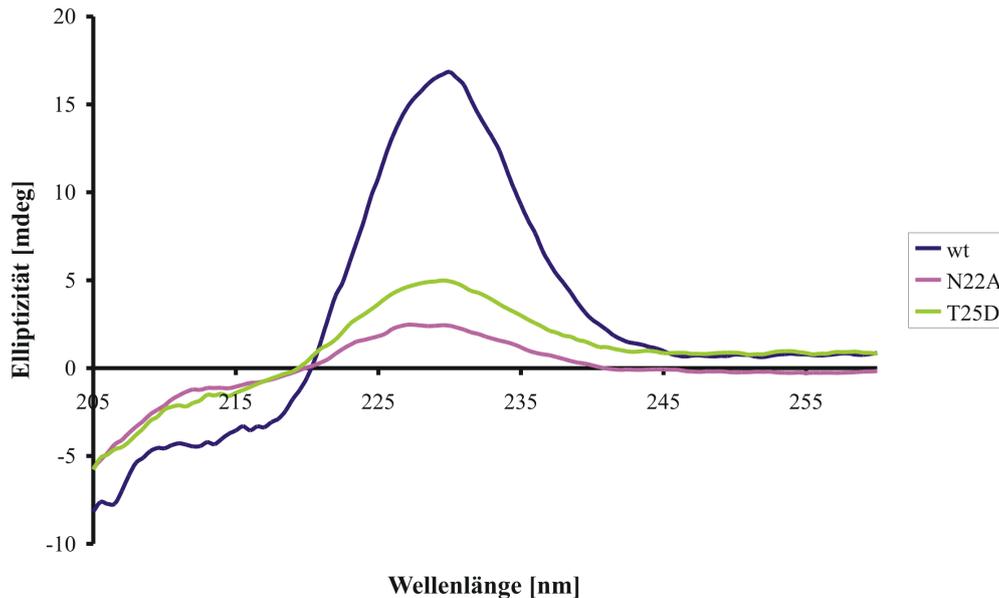


Abbildung 6.23: Faltungsmessungen an FBP28-D15N (4-37) WW-Domänenvarianten der zweiten Schleife (N22A und T25D) mittels CD-Spektroskopie. Der wt zeigt eine typische CD-Kurve für ein korrekt gefaltetes β -Faltblatt einer WW-Domäne mit einem Maximum bei 230 nm. Die Varianten N22A und T25D zeigen bei 230 nm nur eine Elliptizität von 5 mdeg bzw. 2 mdeg und werden daher als nicht korrekt gefaltet eingestuft.

Da die Mutanten nach diesen Daten nicht korrekt gefaltet sind, können sie auch den Liganden nicht binden (Abbildung 6.13). Weiterhin konnte über die nicht zu bestimmenden Schmelzpunkte (Tabelle 6.2) gezeigt werden, dass die Mutanten instabil waren. Somit konnte anhand der Homologie analog zur *hYAP65* WW-Domäne bewiesen werden, warum die Positionen Asn22 und Thr25 in der FBP28-D15N WW-Domäne invariant sind.

6.7 Die hydrophoben Cluster der FBP28-D15N WW-Domäne

In einer früheren Arbeit von Koepf et al. [52] wurde der sogenannte hydrophobe Cluster, welcher wesentlich zur Stabilität der WW-Domäne beiträgt, eingeführt. Die AS, die zum hydrophoben Cluster gezählt werden, sind Trp8, Tyr20 und Pro33 auf der konvexen Seite und Tyr19, Tyr21 und Trp30 auf der konkaven Seite der Domäne nach Macias et al. [55] und zusätzlich nach Nguyen et al. [140] auch Tyr11 (siehe Abbildung 6.19).

Einige AS aus dieser Gruppe werden als konserviert und nahezu nicht variabel ($V \leq 20\%$) eingestuft (Abbildung 6.16 auf Seite 63). Die Zusammenhänge zwischen der Position der AS, Faltung, Stabilität und Bindungsverhalten im Bereich des hydrophoben Clusters soll im Folgenden näher biophysikalisch untersucht werden.

An den Tyrosin-Positionen wurde der Beitrag der Hydrophobizität, des Aromaten und der Hydroxylgruppe zur Stabilisierung der Faltung und zur Bindung zum Liganden bestimmt. Hierzu wurden die Tyrosine schrittweise verändert. Das bedeutete, dass das Tyrosin zu einem Phenylalanin und dann zu einem Zyklohexylalanin (Cha) mutiert wurde. Dadurch wurde aus einem Aromaten mit zusätzlicher funktioneller Gruppe ein Aromat und später ein zyklischer Aliphath ohne funktionelle Gruppe (Abbildung 6.24).

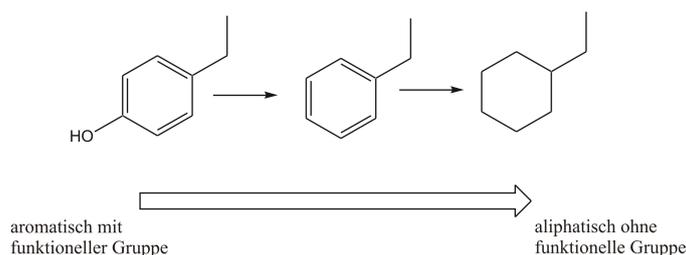


Abbildung 6.24: Schematische Darstellung der Veränderung der Seitenketten vom Tyrosin (Aromat mit funktioneller Gruppe) über Phenylalanin (Aromat) zu Zyklohexylalanin (Nichtaromat).

Alle entsprechenden Einzelaustauschmutanten der FBP28-D15N WW-Domäne wurden mittels SPPS hergestellt und mit CD-Spektroskopie und SPR analysiert (Tabelle 6.3).

Name	Gefaltet?	T_m [°C]	Änderung zu D15N (4-37) in %	K_d [μ M]
Y11F	+	57	-5	309 ± 67
Y19F	+	56	-7	285 ± 75
Y20F	+	44	-27	507 ± 41
Y21F	+	57	-5	467 ± 81
Y11Cha	+	61	+2	n.q.
Y19Cha	+	66	+10	n.q.
Y20Cha	-	24	-60	n.q.
Y21Cha	+	62	+3	n.q.

Tabelle 6.3: Acht synthetisch hergestellte FBP28-D15N WW-Domänenvarianten im hydrophoben Bereich mit Faltungszustand, Schmelzpunkt T_m und Dissoziationskonstante K_d zum Polyprolinliganden PPPLIPPPPPPLPPPPPLIPPPPLPP.

n.q. = nicht quantifizierbar, + = gefaltet, - = nicht gefaltet

Außerdem konnte mittels 1D-NMR-Spektroskopie gezeigt werden, in welchen Bereichen der Domänenvarianten keine geordnete Struktur vorliegt (Abbildungen 6.26 im Unterabschnitt 6.7.1 und 6.27 im Unterabschnitt 6.7.2).

6.7.1 Einfluss der aromatischen Hydroxylgruppe auf Faltung und Bindung zum Liganden

Die erste Veränderung an der Tyrosin-Seitenkette wurde durch Entfernen der Hydroxylgruppe erreicht. Ist diese für die Bindung auf der konkaven Seite wichtig? Welche Rolle spielt sie auf der konvexen Seite?

Die CD-Spektren der Y/F-Mutanten zeigen eine für WW-Domänen typische Kurve (Abbildung 6.25). Bei den Schmelzpunkten zeigte sich, dass der Austausch von Tyr20 zu Phe20 eine nennenswerte Verringerung der Stabilität von 27 % im Vergleich zur FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne hervorrief.

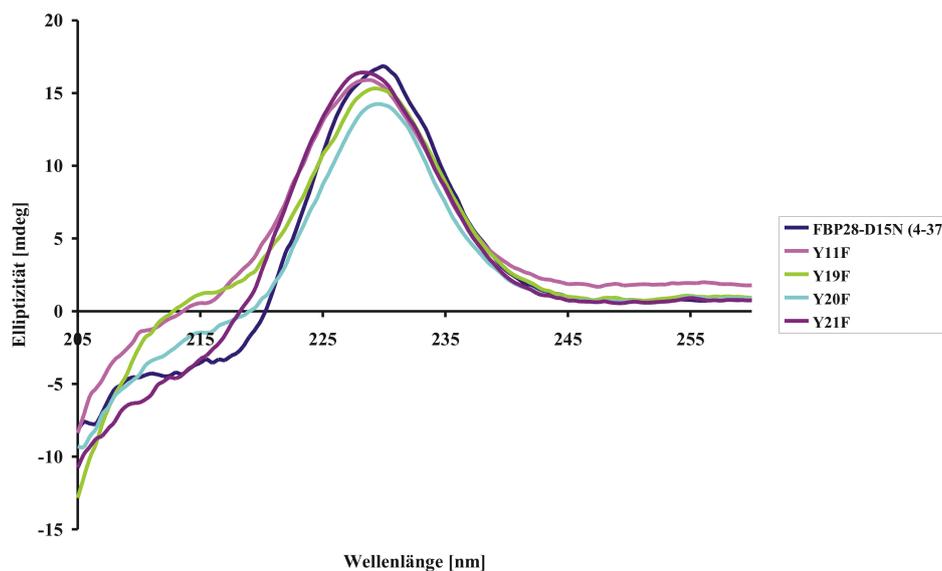


Abbildung 6.25: CD-Spektren der Y/F-Mutanten der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne. Alle Varianten besitzen ein für WW-Domänen typisches Maximum bei 230 nm und sind somit korrekt gefaltet.

Bei NMR-Spektren von WW-Domänen sind aufgelöste Peaks im Aromatenbereich (zwischen 8,5 und 9,5 ppm, Tryptophansignale (um 10 ppm) und das Signal von Pro33 (-0,7 ppm) ein Merkmal für den gefalteten Zustand. Diese Signale entsprechen den AS, die

für die Stabilität der Faltung wichtig sind. Sind diese nicht aufgelöst, so ist das ein Zeichen dafür, dass die Seitengruppen nicht geordnet vorliegen. Die freie Beweglichkeit der Seitenketten spiegelt sich darin wieder, dass an den entsprechenden Stellen im Spektrum keine oder nur schlecht aufgelöste Signale zu finden sind. Bei allen Y/F-Mutanten der FBP28 D15N WW-Domäne sind diese Signale deutlich aufgelöst, was bedeutet, dass alle Mutanten gefaltet sind (Abbildung 6.26).

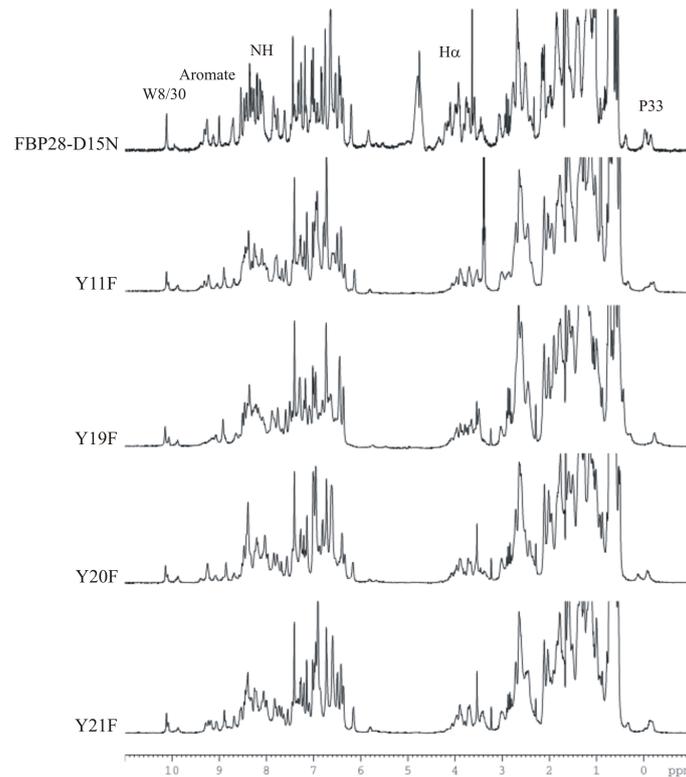


Abbildung 6.26: 1D-NMR-Spektren der Y/F-Mutanten der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne.

Alle Varianten sind gefaltet, zu erkennen an den aufgelösten Signalen, vor allem im Bereich der Aromaten und P33.

Die SPR-Analysen ergaben, dass ebenfalls alle Y/F-Mutanten den Liganden binden. Alle binden den Liganden PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP mit einer ähnlichen Dissoziationskonstante wie die FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne (Tabelle 6.3).

6.7.2 Einfluss des Aromaten auf Faltung und Bindung zum Liganden

Hierzu wurde die aromatische AS Tyrosin an den Positionen 11, 19, 20 und 21 durch Zyklohexylalanin ersetzt. Damit wurden die aromatischen Seitenketten durch aliphatische Ringe ersetzt. Das hatte folgende Auswirkungen:

Die Aromatensignale und das Signal des Pro33 im NMR-Spektrum der Y20Cha-Mutante waren nicht aufgelöst (Abbildung 6.27). Dies ist ein Zeichen dafür, dass die Domänenvariante nicht gefaltet ist.

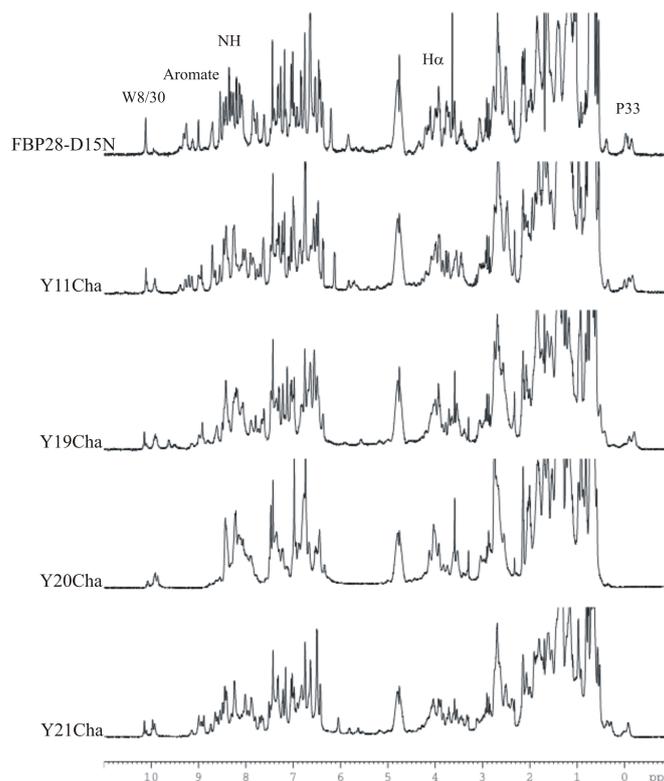


Abbildung 6.27: 1D-NMR-Spektren der Y/Cha-Mutanten der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne.

Die Varianten Y21Cha, Y19Cha und Y11Cha sind gefaltet, zu erkennen an den aufgelösten Signalen, vor allem im Bereich der Aromaten und P33. Die Variante Y20Cha hat keine aufgelösten Signale in diesen Bereichen und ist somit nicht gefaltet.

Die in der NMR gefundene Nichtfaltung der Y20Cha-Mutante konnte durch CD-Messungen bestätigt werden. Diese zeigte starke Verringerung des Schmelzpunktes auf

24 °C. Das entspricht einer Verringerung der Stabilität von 60 % (Tabelle 6.3). Ebenfalls ist das CD-Spektrum der Y20Cha-Mutante auffällig niedrig in der Elliptizität (5 mdeg) bei 230 nm. Die Cha-Mutanten auf der konkaven Seite dagegen (Y11Cha, Y19Cha und Y21Cha) sind gut gefaltet und haben eine ähnliche Stabilität wie die FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne (Abbildung 6.25 und Tabelle 6.3). Die Y19Cha-Mutante ist mit 66 °C sogar um Einiges stabiler als die unmutierte Domäne.

Die SPR-Analysen zeigen, dass alle vier Cha-Mutanten nicht funktionell vorliegen. Sie binden den Polyprolinliganden nicht.

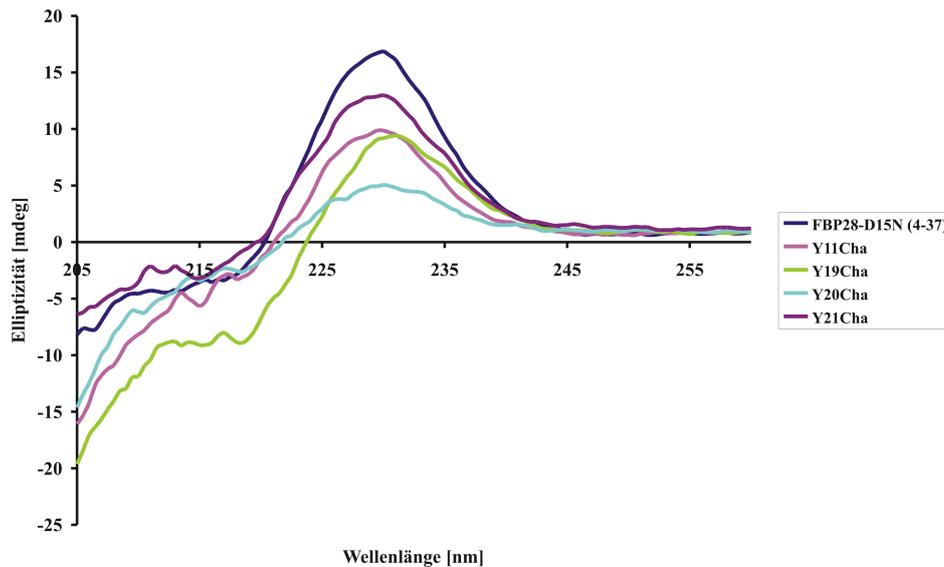


Abbildung 6.28: CD-Spektren der Y/Cha-Mutanten der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne.

Die Varianten Y11Cha und Y21Cha besitzen ein für WW-Domänen typisches Maximum bei 230 nm und sind somit korrekt gefaltet. Die Variante Y20Cha wird anhand der Kurve als nicht gefaltet (Elliptizität bei 230 nm bei 5 mdeg) und Y19Cha als nicht ausgeprägt gefaltet (Vergleich mit Y11Cha) eingestuft.

Was kann man nun aus diesen Ergebnissen schließen? Der hydrophobe Cluster auf der konvexen Seite (Abbildung 6.19) wird schon durch das Entfernen der Hydroxylgruppe destabilisiert. Die Faltung bleibt aber erhalten. Bei der Insertion der Cha-Seitenkette bricht das β -Faltblatt zusammen. Damit ist klar, dass die Struktur der WW-Domäne nur dann aufrecht erhalten werden kann, wenn an der Position 20 ein Aromat eingesetzt wird. Dies wird auch in den Substitutionsanalysen bestätigt (Abbildungen (6.13) auf Seite 59 und (6.15) auf Seite 61). Die Bindung zum Liganden geht in dem Moment

verloren, in dem die Faltung der Domäne zusammenbricht. Die aromatische Hydroxylgruppe ist nicht zwingend notwendig, um die Struktur zu erhalten, trägt aber wesentlich zu ihrer Stabilisierung bei. Die Differenz im Schmelzpunkt der Y20F zur FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne beträgt 16 °C, was einer Verringerung der Stabilität von 27 % entspricht. Vermutlich wird der hydrophobe Cluster auf der konvexen Seite durch die Hydroxylgruppe vom Wasser abgeschirmt.

Auf der konkaven Seite der Domäne (Abbildung 6.19) findet, analog zu anderen WW-Domänen, die Bindung zum Liganden statt. Anhand der K_d -Werte (Tabelle 6.3), die hier gemessen wurden, wird klar, dass für eine Bindung vorerst nur ein Aromat in den Positionen 11, 19 und 21 nötig ist, nicht aber eine zusätzliche Hydroxylgruppe. Es ist kein Zusammenbrechen der Struktur durch die Austausch gegen Phe oder Cha an den Positionen 11, 19 und 21 zu beobachten (siehe Spektren 6.25 und 6.28 und Tabelle 6.3). Allerdings zeichnet sich eine Tendenz ab. Die Phe-Mutanten sind etwas weniger stabil und die Cha-Mutanten etwas stabiler als die FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne. Die Y19Cha-Mutante ist sogar um bemerkenswerte 10 % stabiler, obwohl die Position 19 in der Literatur [55] als konserviert eingestuft wird. Mit dem Zyklohexylalanin ist an dieser Stelle kein aromatisches *stacking* möglich, und doch wird kein Zusammenbrechen der Struktur beobachtet. Insgesamt lässt sich aufgrund dieser Daten sagen, dass Aromaten zwar für die Bindung essenziell, nicht jedoch für die Aufrechterhaltung der Struktur notwendig sind. Augenscheinlich braucht man dafür nur voluminöse, hydrophobe Seitenketten. Dies soll im Weiteren untersucht werden.

6.7.3 Untersuchung zu Kationen-Aromat-Wechselwirkungen in den hydrophoben Clustern

In der Literatur werden zur Stabilisierung Kationen-Aromat-Wechselwirkungen [13] beschrieben. Da Aromaten durch ihr konjugiertes π -System mit den delokalisierten Elektronen quasi einen negativen Ladungsschwerpunkt im Molekül besitzen, könnten diese mit Kationen, wie Arginin oder Lysin, wechselwirken (Abbildung 6.29).

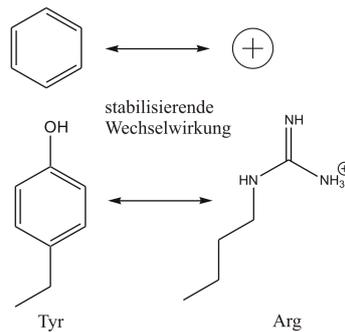


Abbildung 6.29: Aromaten-Kationen-Wechselwirkungen können stabilisierend in einem Protein wirken [13]. Als Beispiele dienen hier Tyrosin (Aromat) und Arginin (liegt unter physiologischen Bedingungen als Kation vor).

Arginin enthält neben der Eigenschaft des Kations auch die einer hydrophoben Kette. Mit einer Mutation durch Arginin an den Tyrosin-Positionen kann überprüft werden, ob sich stabilisierende Aromaten-Kationen-Wechselwirkungen ausbilden können. Weiterhin soll überprüft werden, ob auf der konkaven Seite die hydrophoben Seitenketten, welche beim Arginin nicht ringförmig sind, die Struktur trotzdem erhalten. Es wurden Arg-Mutanten aller Aromaten der hydrophoben Cluster hergestellt (Y/R-Mutanten, W30R-Mutante, Tabelle 6.4). Die W8R-Mutante wurde nicht untersucht, da aus den bisherigen Daten hervorging, dass der hydrophobe Cluster auf der konvexen Seite nicht an der Ligandenbindung beteiligt ist. Die Funktionalität der Varianten geht in dem Moment verloren, indem die Struktur denaturiert. Das legt nahe, dass Nichtbinder in dieser Position nicht gefaltet sind.

Name	Gefaltet?	T_m [°C]	Änderung zu D15N (4-37) in %	K_d [μM]
Y11R	+	61	+2	n.d.
Y19R	-	n.q.		n.d.
Y20R	-	32	-47	n.d.
Y21R	+	56	-7	n.d.
W30R	+	46	-23	n.d.

Tabelle 6.4: Fünf synthetisch hergestellte FBP28-D15N WW-Domänenvarianten mit Faltungszustand, Schmelzpunkt T_m und Dissoziationskonstante K_d zum Polyprolinliganden PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP.

+ = gefaltet, - = nicht gefaltet

n.q. = nicht quantifizierbar, n.d. = nicht determiniert, da keine Bindung auf der Membran (Abbildung 6.13)

Aus den CD-Spektren der Y/R-Mutaten (Abbildung 6.30) ist zu entnehmen, dass die Graphen der Y20R-, aber auch der Y19R-Mutante bei 230 nm kein hohes Maximum der Elliptizität (ca. 5 mdeg) ergeben. Dies deutet auf eine nicht bzw. schlecht gefaltete Domänenvariante hin.

Wie erwartet, ergaben die SPR-Messungen, dass alle Y/R und die W30R-Mutante den Ligand nicht banden (Abbildung 6.13 auf Seite 59).

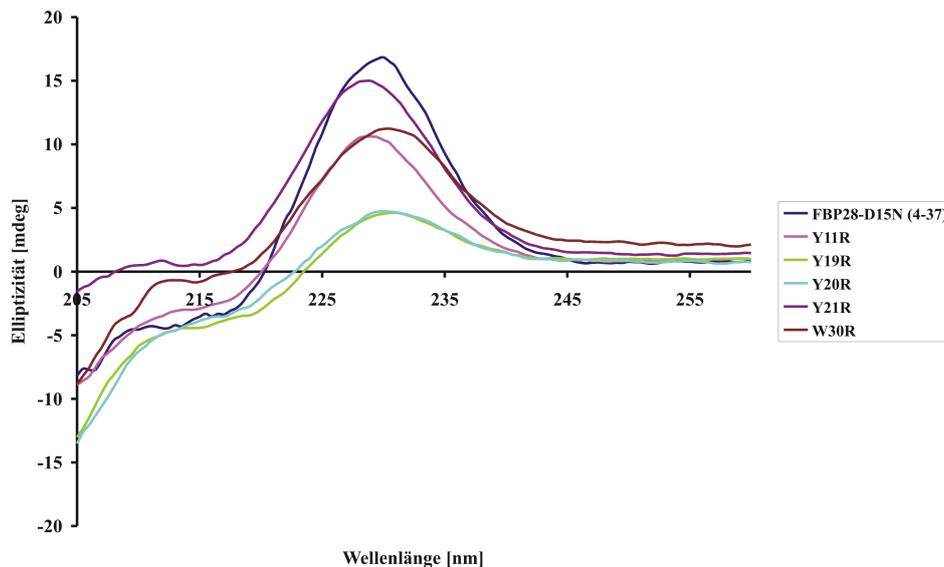


Abbildung 6.30: CD-Spektren der Y/R-Mutanten der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne.

Die Varianten Y11R, Y21R und W30R besitzen ein für WW-Domänen typisches Maximum bei 230 nm und sind somit korrekt gefaltet. Die Variante Y20R und Y19R wird anhand der Kurve als nicht gefaltet (Elliptizität bei 230 nm bei 5 mdeg) eingestuft.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die konvexe Seite, und damit auch für die Stabilität der Domäne, die Notwendigkeit des Aromaten in der Position 20 bestätigt wird. Eine Bindung des Liganden ist aufgrund der nicht vorhandenen Faltung nicht zu beobachten. Eine Kationen-Aromaten-Wechselwirkung oder gar Stabilisierung durch Position 20 wurde nicht gefunden.

Auf der konkaven Seite hingegen sind die Mutanten Y11R und Y21R gefaltet und stabil. Die Annahme, dass nur große, hydrophobe Reste (hier die aliphatische Kette des Arginins) für die Stabilisierung der FBP28-D15N WW-Domäne in diesen Positionen notwendig sind, wird damit bestätigt. Allerdings liefert die Beobachtung, dass

Y11R und Y21R-Mutanten gefaltet vorliegen, keine schlüssigen Argumente gegen eine Kationen-Aromaten-Wechselwirkung. Für die Ligandenbindung bestätigt sich wieder die Notwendigkeit der Aromaten, da experimentell keine Bindung nachgewiesen werden konnte.

Die Position 19 auf der konkaven Seite muß gesondert betrachtet werden. Macias et al. [55] fanden, dass Tyr19 hochkonserviert ist und zur Gesamtstabilität beiträgt. Zunächst decken sich hier die Ergebnisse bezüglich der Ligandenbindung mit denen der Positionen 11 und 21. Ohne Aromat entsteht keine Bindung. Das CD-Spektrum der Y19R-Mutante zeigt eine Kurve, die eine schlechte Faltung impliziert (Abbildung 6.30) und deren Schmelzpunkt nicht bestimmbar ist. Dies legt nahe, dass diese Position einen größeren Anteil an der Stabilität der Domäne hat, der mit der zentralen Position der AS in der Domäne einher geht. Dieser Beitrag kann aber nur mit einem großen und vor allem voluminösen Rest erreicht werden (Aromaten, aliphatische Ringe). Eine stabilisierende Kationen-Aromaten-Wechselwirkung mit einem Arginin an Position 19 kann daher ausgeschlossen werden.

Die Arginin-Mutante W30R (konkave Seite) wurde ebenfalls untersucht (Tabelle 6.4) und es wurde festgestellt, dass zwar die Bindung zum Liganden aufgehoben wurde, aber sogar an dieser konservierten Stelle die Stabilität der Domäne durch Mutation nicht herabgesetzt wird. Somit kann eine Kationen-Aromat-Wechselwirkung an der Position 30 postuliert werden, wenn auch nicht stabilisierend im Vergleich zur FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne.

6.7.4 Weitere Varianten der Tyr-Positionen der hydrophoben Cluster

Zuletzt wurde untersucht, ob Aliphaten oder geladene Reste die FBP28-D15N WW-Domäne an den Tyrosin-Positionen 11, 19, 20 und 21 stabilisieren. Es wurden ein kleiner, hydrophober, aliphatischer Rest (Leu) und ein kleiner, geladener Rest (Asp) ausgewählt, die entsprechenden Domänenvarianten synthetisiert und analysiert (Tabelle 6.5). Diese stellen alle Nichtbindervarianten dar.

Name	Gefaltet?	T _m [°C]	Änderung zu D15N (4-37) in %
Y11L	+	22	-64
Y11D	+	46	-24
Y19L	(+)	54	-10
Y19D	-	n.q.	
Y20L	-	n.q.	
Y20D	-	n.q.	
Y21L	+	57	-5
Y21D	+	n.q.	

Tabelle 6.5: Acht synthetisch hergestellte FBP28-D15N (4-37) WW-Domänenvarianten mit Faltungsstatus, Schmelzpunkt T_m und Dissoziationskonstante K_d zum Polyprolinliganden PPPLIPPPPPPLPPPPPLIPPPPPPLPP. n.q. = nicht quantifiziert, + = gefaltet, - = nicht gefaltet, (+) = Faltung nicht gut ausgeprägt

Anhand dieser Daten ist zu erkennen, dass FBP28-D15N-Varianten mit Leu- und Asp-Mutationen in der Position 20, wie erwartet, nicht gefaltet sind (Abbildung 6.31, 6.32) und diese Varianten binden den Liganden nicht. Dies bestätigt wieder die Notwendigkeit der Aromaten für die konvexe Seite.

Auf der konkaven Seite der Domäne sind alle Leu- und Asp-Mutanten in Position 11 und 21 gefaltet. Die Schmelzpunkte der Leu-Varianten lagen nahe an denen der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne. Die der Asp-Varianten waren nicht bestimmbar. Dies bestätigt, dass in diesen Positionen Substitutionen beliebiger AS an der Faltung nichts ändern: Hydrophobe Reste bilden eher stabile Domänen-Varianten als geladene Reste. Die Y19D-Variante war nicht gefaltet. Zudem zeigt die Y19L-Variante eine weniger gute β -Faltblattkurve als die Mutanten an Position 11 und 21. Dies bedeutet für die Faltung der Domäne, dass Position 19 die mit ihrer zentralen Stellung in der Domäne auf der konkaven Seite nicht nur für die Bindung zum Liganden der Domäne verantwortlich ist, sondern auch für die Stabilität eine gewisse Rolle spielt (Abbildung 6.31 und 6.32).

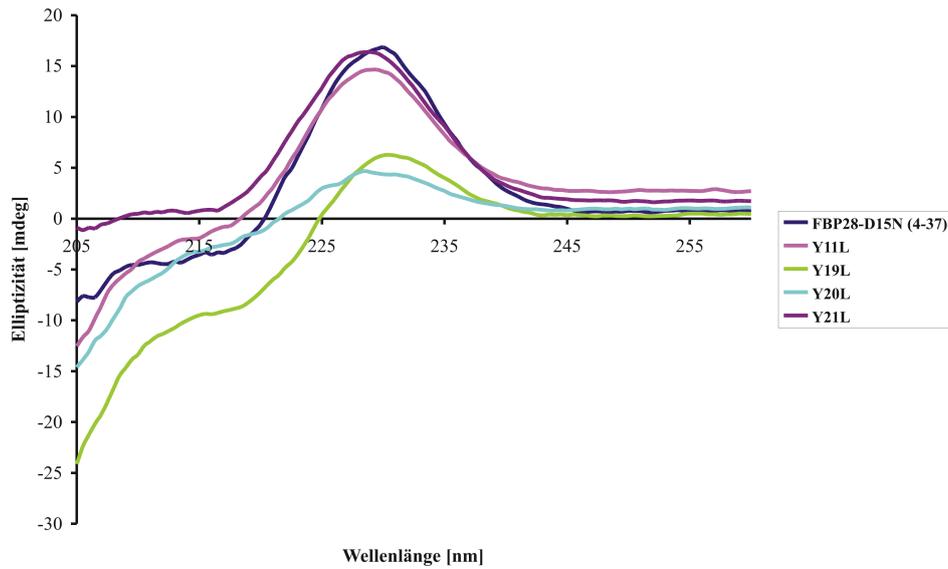


Abbildung 6.31: CD-Spektren der Y/L-Mutanten der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne. Die Varianten Y11L und Y21L besitzen ein für WW-Domänen typisches Maximum bei 230 nm und sind somit korrekt gefaltet. Die Varianten Y20L und Y19L wird anhand der Kurve als nicht gefaltet (Elliptizität bei 230 nm bei 5 mdeg) eingestuft.

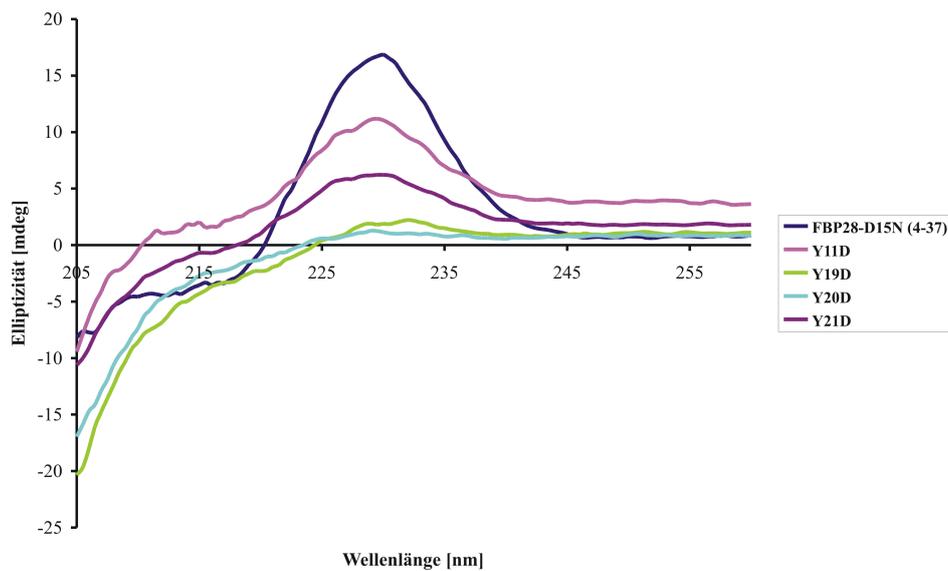


Abbildung 6.32: CD-Spektren der Y/D-Mutanten der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne. Die Varianten Y11D und Y21D besitzen bei 230 nm eine Elliptizität bei ca. 5 mdeg und werden somit als schlecht gefaltet eingestuft. Die Variante Y20D und Y19D sind, wie aus der Kurve folgt, nicht gefaltet (Elliptizität bei 230 nm bei 2 mdeg).

Zusammenfassend lassen sich für Faltung, Stabilität und Bindungsverhalten im Bereich der hydrophoben Cluster der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne folgende Schlussfolgerungen ziehen:

Auf der konvexen Seite der Domäne spielt die Position 20 eine wesentliche Rolle für die Stabilisierung der Struktur. Hier muss ein Aromat enthalten sein, um die Struktur aufrechterhalten zu können. Eine Mutation vom Tyr zum Phe hat bereits eine erhebliche Destabilisierung zur Folge. Dies bestätigt die Funktion der aromatischen Hydroxylgruppe, die vermutlich den Cluster von Wasser abschirmt. Alle anderen Mutationen, die keine Aromaten in der Position 20 enthalten, sind erheblich destabilisiert oder gar nicht gefaltet (Tabelle 6.6). Eine Bindung eines Liganden ist nur dann gegeben, wenn eine stabile Struktur vorhanden ist.

Position/Mutation	F	Cha	R	L	D
Y11	-5 (+)	+2 (+)	+2 (+)	-64 (+)	-24 ((+))
Y19	-7 (+)	+10 (+)	(-)	-10 ((+))	(-)
Y20	-27 (+)	-60 (-)	-47 (-)	(-)	(-)
Y21	-5 (+)	+3 (+)	-7 (+)	-5 (+)	((+))

Tabelle 6.6: Alle Schmelztemperaturen für alle Mutationen in allen Tyrosin-Positionen in % in Vergleich zur FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne ($T_m = 60\text{ °C}$)
(+) = gefaltet, ((+)) = nicht gut gefaltet, (-) = nicht gefaltet

Auf der konkaven Seite der Domäne, der Ligandenbindungsseite, ist nur bei einem Austausch gegen einen Aromaten eine Bindung zum Liganden vorhanden. Für die Stabilität der Domäne sind in den Positionen 11, 19 und 21 kleine, geladene Reste ungünstig. Aromaten und aliphatische, ringförmige Reste begünstigen dagegen die Strukturausbildung (Tabelle 6.6). In den Positionen 11 und 21 reichen sogar kleine Aliphaten.

6.8 Ligandenunterstützte Stabilisierung der Faltung

Es ist bekannt, dass die Bindung eines Liganden an ein Protein oder eine Domäne die Faltung beeinflusst oder diese gar erst induziert [62]. Lässt sich ein Einfluss des Peptidliganden auf die Domänenstabilität der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne nachweisen? Für diese Untersuchungen wurde einerseits die ligandenbindende Variante KT(12,13)E gewählt, andererseits eine nichtbindende Variante Y11R zum Vergleich herangezogen. Der Binder ist zwar gut gefaltet (Abbildung 6.22), aber mit einem Schmelzpunkt von 32 °C nicht sonderlich stabil, so dass für diesen eine Stabilitätserhöhung zu erwarten

sein sollte. Dagegen ist der Nichtbinder von sich aus mit 61 °C sehr stabil und eine Verbesserung der Stabilität durch den Liganden ist nicht zu erwarten. Zum Vergleich wurde ebenfalls die FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne untersucht. Dazu wurden zunächst die Domänenvariante und der Polyprolinligand einzeln mittels CD-Spektroskopie vermessen und dann ein Spektrum von beiden zusammen aufgenommen. Außerdem wurden auch die Stabilitäten der einzelnen Peptide und des Komplexes mittels der CD-Schmelzpunktbestimmung ermittelt.

Name	Gefaltet?	T _m [°C] ohne Ligand	T _m [°C] mit Ligand	Änderung [%]
D15N (4-37)/Ligand	+	60	59	2
Y11R/Ligand	+	61	62	-2
KT(12,13)E/Ligand	+	32	53	65

Tabelle 6.7: Drei FBP28 WW-Domänen-Varianten im Komplex mit dem Polyprolin-Liganden PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP mit Faltungszustand und dem Komplexschmelzpunkt T_m.

Aus den gemessenen Daten (Tabelle 6.7, Abbildung 6.33) bestätigte sich, dass im Fall des Nichtbinders Y11R durch Zugabe der Polyprolinliganden keine signifikante Änderung in der CD-Kurve (Abbildung 6.33 B), sowie keine Erhöhung des Schmelzpunktes zu verzeichnen war. Die FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne erkennt den Liganden mit einer Affinität von $K_d = 223 \pm 60 \mu\text{M}$ (SPR). Eine ligandeninduzierte Faltungsstabilisierung dieser Domäne konnte nicht festgestellt werden. Der Schmelzpunkt blieb unverändert, lediglich eine unwesentliche Erhöhung der Elliptizität auf 5 mdeg (Abbildung 6.33) wurde ermittelt. Die Variante KT(12,13)E bindet den Liganden mit einer Bindungskonstante von $600 \pm 228 \mu\text{M}$ und zeigte im Komplex ein CD-Spektrum mit einer Erhöhung des Elliptizitätswertes bei 230 nm um 7 mdeg (Abbildung 6.33 C). Die Stabilitätserhöhung konnte durch den Anstieg des Schmelzpunktes von 32 °C (Domäne ohne Ligand) auf 53 °C (Domäne mit Ligand) verifiziert werden. Dieser Anstieg um 21 °C entspricht einer 65 %igen Erhöhung der Stabilität.

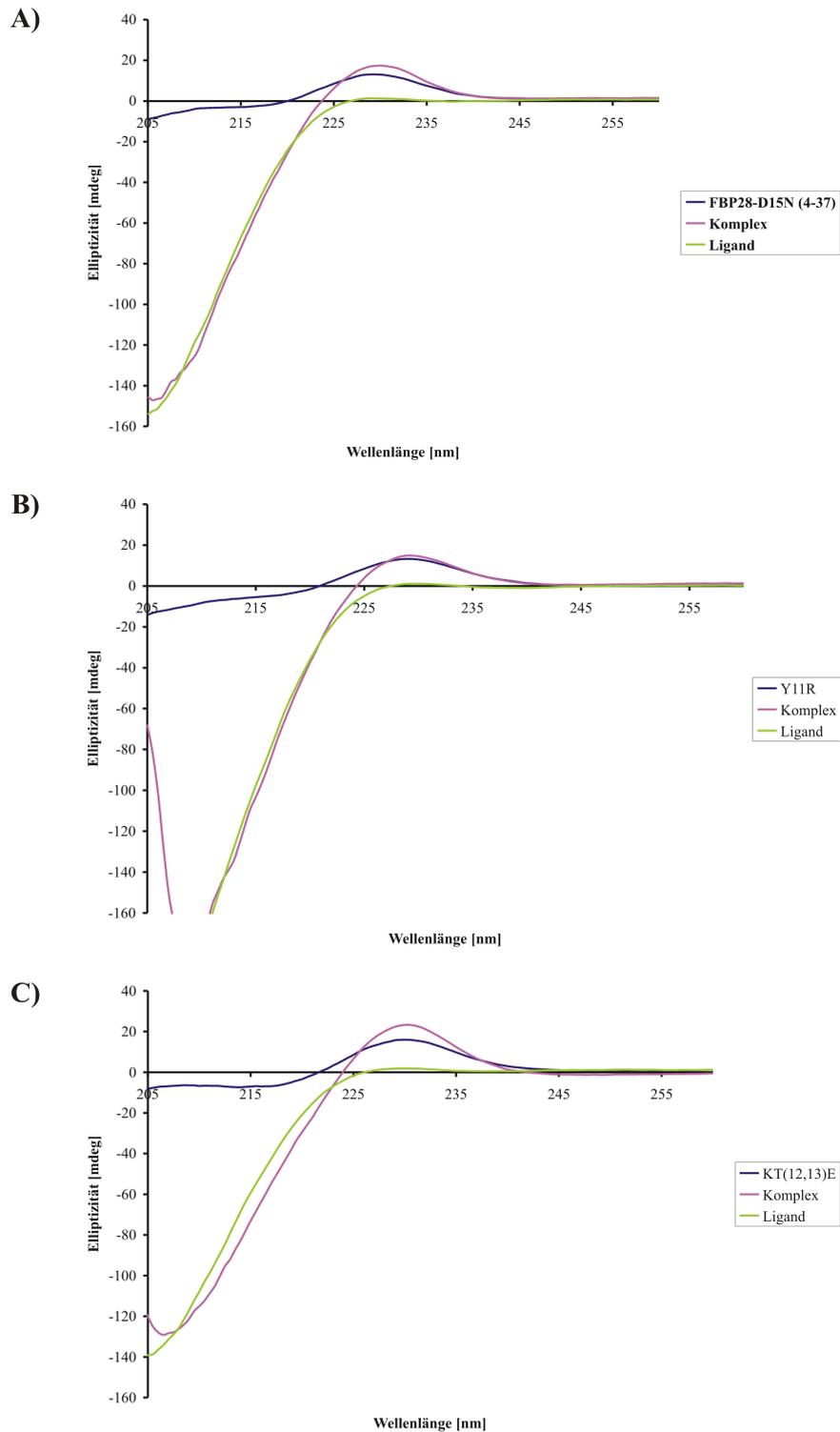


Abbildung 6.33: Messung der ligandenunterstützten Faltungstabilisierung
A) der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne,
B) des Nichtbinders Y11R
C) des Binders KT(12,13)E mittels CD-Spektroskopie.
 Ligand = PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP

Ligand (grün) zeigt eine typische Kurve einer Polyprolinhelix, die in die Komplexkurve der Domänenvarianten (pink) mit eingeht. Veränderung der Elliptizität bei 230 nm der Komplexkurve zu höheren Elliptizitätswerten im Vergleich zur Domänenkurve (blau). Nachweis der ligandenunterstützten Faltungstabilisierung.

Die Stabilisierung der Faltung der Domäne durch die Bildung eines Komplexes mit dem Liganden läßt sich damit begründen, dass die Polyprolinhelix des Prolinliganden nur in einer einzigen räumlichen Anordnung im hydrophoben Cluster der Domäne liegen kann. Diese kann beispielsweise durch den Liganden unterstützt werden. Im Beispiel der FBP28-D15N-Variante KT(12,13)E ist bereits eine Faltung vorhanden, die aber nicht stabil vorliegt. Die Bindung des Liganden an den konkaven, hydrophoben Cluster konnte die Faltung der Domänen-Variante stabilisieren. Diese Stabilisierung läßt sich damit begründen, dass der Polyprolinligand stärker an der KT(12,13)E-Mutante im gefalteten, stabilen Zustand bindet, als im gefalteten, instabilen Zustand. Es liegen hier drei Gleichgewichte vor: gefaltet/stabil vs. gefaltet/instabil (beide ohne Ligand), mit/ohne Ligand (gefaltet/stabil) und mit/ohne Ligand (gefaltet/instabil). Diese drei Gleichgewichte sind gekoppelt. Wenn nun also der Ligand stärker an die gefaltete/stabile als an die gefaltete/instabile Domäne bindet, zieht er das Gleichgewicht stärker auf die Seite der gefalteten/stabilen Domäne. Im Fall der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne liegt diese bereits ohne Ligand im gefalteten/stabilen Zustand vor. Damit wird auch keine weitere Stabilisierung durch die Bindung des Liganden stattfinden, die sich in einer Erhöhung des Schmelzpunktes ausdrücken würde.

Für eine zusätzliche Bestimmung der Bindungskonstante bei der Komplexbildung, wurden ITC-Messungen der genannten Systeme durchgeführt. Im Fall der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne wurde eine Bindungskonstante von $25 \mu\text{M}$ bestimmt. Diese weicht um $198 \mu\text{M}$ von der mit SPR bestimmten ab. Ebenso verhält es sich bei der KT(12,13)E-Mutante, bei der eine K_d von $25 \mu\text{M}$ im Gegensatz zur SPR-Messung ($575 \mu\text{M}$ Abweichung) bestimmt wurde. Die starken Abweichungen von den SPR-Messungen lassen sich mit der Immobilisierung einer Komponente bei SPR-Messungen im Gegensatz zu den beiden in Lösung befindlichen Komponenten bei ITC-Messungen begründen. Möglicherweise ist die Dichte des Liganden auf dem BIACORE-Chip für eine optimale Bindung zu groß, so dass die einzelnen Moleküle nicht in der Lage sind, sich in die Bindungstasche der Domäne zu legen. Zudem ist die Stöchiometrie der Domäne zum Liganden 0,5, das heißt, dass durch die Verdopplung der Ligandensequenz von PPPLIPPPPLPP auf PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP ein Tandemligand entsteht, der zwei Domänen bindet. Ist der Ligand auf dem Chip immobilisiert, wird ein Teil des Tandemliganden nicht zugänglich sein, was zu einer schlechteren Bindungskonstante im Vergleich zur ITC-Messung führt. Die Bedingungen in Lösung spiegeln die *in vivo*-Umgebung der Domäne realistischer wider, als eine bei der Messung immobilisierte Komponente in hoher Dichte.

Mittels der ITC-Messung konnte auch gezeigt werden, dass der Beitrag zur Bindung des Liganden an die FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne eher enthalpisch ist. Dagegen ist für die Bindung an die KT(12,13)E-Mutante die Entropie ausschlaggebend. Die Bindungskonstante ist für beide gleich. Dies lässt sich mit der Enthalpie-Entropie-Kompensation folgendermaßen erklären. Eine gut gefaltete Domäne, wie die FBP28-D15N (4-37) ist weniger flexibel als eine zwar gefaltete, aber instabile Domäne (KT(12,13)E-Mutante). Eine Komplexierung der ersteren resultiert in einer hohen, negativen Enthalpieänderung. Die dadurch verhältnismäßig hohe entstehende Rigidität und die damit verbundene Abnahme der Entropie resultiert dennoch in einer exothermen Reaktion. Dagegen sind bei einer instabileren Domäne mehr Wassermoleküle angelagert, die bei einer Komplexierung durch den Liganden verdrängt werden. Dieser Prozeß trägt zur Entropiezunahme bei. Gleichzeitig wird dieser Effekt bei der Komplexierung gemindert. Im Vergleich zu der Enthalpieänderung der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne ist die der KT(12,13)E-Mutante geringer. Diese gegenseitige Kompensation führt letztendlich zu gleichen Bindungskonstanten.

6.9 Mutation des Rückgrates im hydrophoben Cluster der FBP28-D15N WW-Domäne

Die Mutation an den Seitenketten einer Domäne stellt die Bedeutung der einzelnen Positionen in der Sequenz für die Stabilität und/oder Bindung zum Liganden heraus. Dass die Seitenketten eine wichtige Rolle für die Stabilität eines β -Faltblattes (im Gegensatz zur α -Helix) spielen [6, 7, 5], ist bekannt. Am wichtigsten jedoch sind die Wasserstoffbrücken im Rückgrat [6]. Ein kontrolliertes Ausschalten dieser Wechselwirkungen würde weitere Informationen über Stabilität und Bindung zum Liganden in der Domäne liefern können. Dies wurde mit chemisch-synthetischen Methoden realisiert. Speziell konstruierte "Pseudo-Dipeptidbausteine" sollten in die Faltblattstruktur eingebaut werden. Diese Bausteine wiesen anstatt einer Amidbindung eine Amin- oder Doppelbindung auf (Abbildung 6.34). Damit konnte eine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff bzw. beide Wasserstoffbrücken zur entsprechenden nächsten Amidbindung ausgeschaltet werden, und die damit verbundenen Veränderungen für die Domäne untersucht werden. Der zu modifizierende Bereich betraf die zentralen Tyrosine 19, 20 und 21.

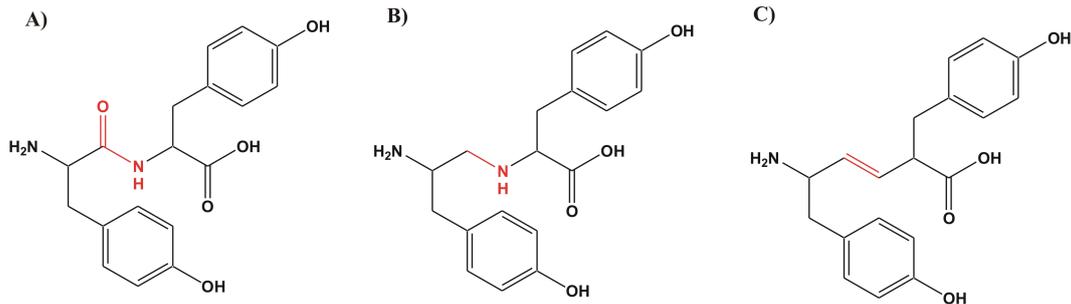


Abbildung 6.34: A) Tyr-Tyr-Dipeptid
 B) Tyr-Tyr-Methylenamin-Isoster
 C) Tyr-Tyr-E-Alken-Isoster.

Diese Wahl wurde aus zwei Gründen getroffen. Zum einen werden die Wasserstoffbrücken des Bereiches ausgeschaltet, der für die Stabilität und Bindung zum Liganden der Domäne wichtig ist. Zum anderen kann der Baustein durch das Hintereinanderliegen von drei Tyrosinen zweimal eingesetzt werden. Damit kann an zwei Stellen (Position 19/20 und 20/21) der Einfluss der Wasserstoffbrücken untersucht werden, ohne des Aufwandes einer Neusynthese eines anderen Dipeptidbausteines. Die Dipeptidbausteine wurden von Nina Bandur an der Phillips-Universität in Marburg im Rahmen der Forschergruppe 475 hergestellt.

Name	Sequenz der FBP28-D15N WW-Domänen-Varianten mit Isosterbausteinen	Gefaltet?	T _m [°C]
Y20Y21-Amin	AVSEWTEYKTANGKTY $\text{Y-CH}_2\text{-NH-}$ YNNRTLESTWEKPQELK	-	n.q.
Y19Y20-Amin	AVSEWTEYKTANGKTY $\text{-CH}_2\text{-NH-}$ YNNRTLESTWEKPQELK	-	n.q.
Y20Y21-E-Alken	AVSEWTEYKTANGKTY $\text{-C}_2\text{H}_2\text{-}$ YNNRTLESTWEKPQELK	-	n.q.
Y19Y20-E-Alken	AVSEWTEYKTANGKTY $\text{-C}_2\text{H}_2\text{-}$ YNNRTLESTWEKPQELK	-	n.q.

Tabelle 6.8: Vier FBP28-D15N (4-37) WW-Domänen-Varianten mit Isosterbausteinen mit Faltungszustand und Schmelzpunkt T_m.

N = AS, die für die Synthese modifiziert werden musste

Y-CH₂-NH-Y = Isosterbaustein an der Stelle YY

- = nicht gefaltet, n.q. = nicht quantifizierbar

Zunächst wurde ein Tyr-Tyr-Dipeptid-Isoster mit einer Amin-Methylen-Bindung hergestellt und an den Positionen 19/20 und 20/21 eingebaut. Der Einbau erfolgte wie der jeder anderen AS unter Fmoc-Bedingungen. Dabei ist anzumerken, dass beim Einbau

des Isosters in die Positionen 19/20 der nächstfolgende Schritt der Einbau des Pseudoprolins Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{Me,Me}_{pro}$)-OH an der Position 17/18 war. Dies hatte einen Abbruch der Sequenz an dieser Stelle bzw. Fehlsequenzen (Fehlen des Pseudoprolins) zur Folge. Die Kopplung zweier Dipeptidbausteine (Isooster-Baustein und Pseudoprolin-Baustein) hintereinander war offensichtlich problematisch. Die Lösung war das Verschieben des Pseudoprolins von der Position 17/18 hin zur Position 12/13 (siehe Abbildung 6.14 auf Seite 60). Mit dieser Veränderung verlief die Synthese erfolgreich (Tabelle 6.8, Abbildungen 6.35 und 6.36).

Anschließend wurden beide Varianten (Aminbindung zwischen Position 19/20 und zwischen 20/21) biophysikalisch untersucht. Aus dem NMR-Spektrum (Abbildung 6.38) ist zu erkennen, dass die Methylenamin-Isostervarianten eine gewisse Ordnung besitzen, erkennbar anhand der aufgelösten Peaks, aber im Bereich der Aromaten offensichtlich keine Faltung vorliegt (keine Aromatenpeaks im Vergleich zum wt). Zudem ist bei beiden der Pro33-Peak ebenfalls nicht aufgelöst, was ein weiteres Anzeichen für das Fehlen eines korrekt gefalteten β -Faltblattes ist. Aus den oben genannten Feststellungen zur Stabilität der FBP28-D15N WW-Domäne wird klar, dass bei einer freien Beweglichkeit der Aromaten und des Pro33 keine stabile Faltung möglich ist. Gleichzeitig zeigt das CD-Spektrum der Methylenamin-Isostere (siehe Abbildung 6.37) keinen typischen Kurvenverlauf für eine WW-Domäne. Beide Amin-Methylen-Isoster-Varianten der FBP28-D15N WW-Domäne sind demnach nicht gefaltet. Eine Bindung an den Liganden PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP konnte ebenfalls nicht gezeigt werden (Messung mit SPR). Da bereits bei anderen WW-Domänen [62] gezeigt wurde, dass eine Faltung auch durch einen Liganden induziert werden kann, sollte der Versuch unternommen werden, dieses auch bei den Methylenamin-Isosteren zu zeigen. Dazu wurden diese mit dem Liganden PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP je 1 h bzw. 3 h bei RT inkubiert und mittels CD-Spektroskopie analysiert. Dabei konnte jedoch ebenfalls keine Faltung nachgewiesen werden.

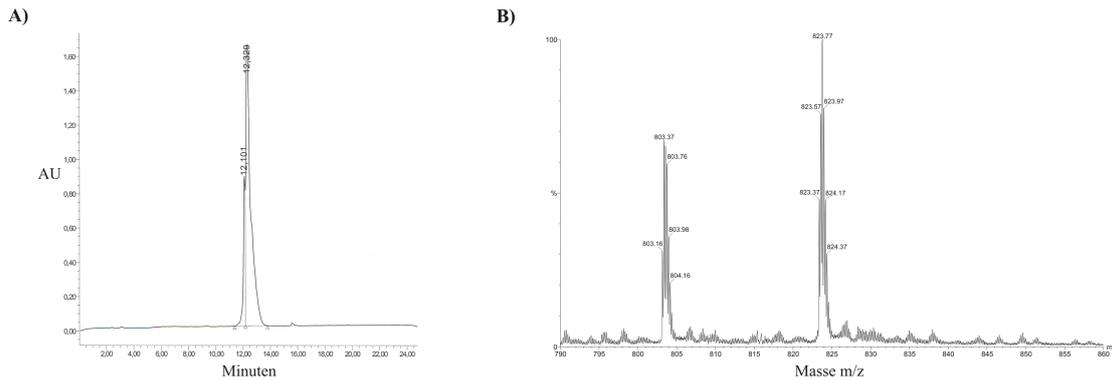


Abbildung 6.35: Analyse des mit SPPS synthetisierten Methylenamin-Isosters (Position 19/20) der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne.

A) RP-HPLC Chromatogramm, $R_t = 12,1$ min (Peakflächenintegration entspricht 16 % Reinheit), Hauptpeak $R_t = 12,3$ min (Peakflächenintegration entspricht 84 % Reinheit).

B) ESI-MS-Spektrum der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne, Detektion des fünffach geladenen Produkts (Hauptpeak),
 Masse (berechnet) = 4111,99 g/mol Masse (gefunden) = m/z 823,37 $[M+5H]^{5+}$ (entspricht 4111,85 g/mol)
 Nebenpeak bei m/z 803,16 $[M+5H]^{5+}$ entspricht einer fehlenden Masse von 101,5 g/mol (entspricht Thr)

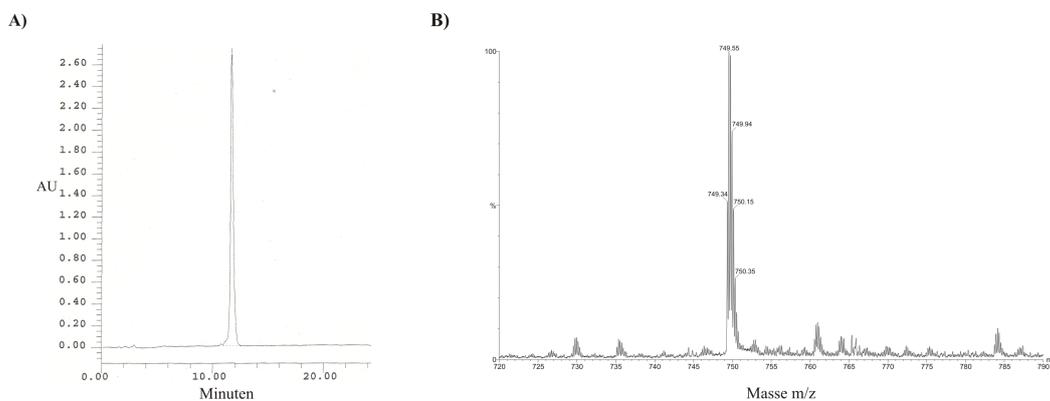


Abbildung 6.36: Analyse des mit SPPS synthetisierten Methylenamin-Isosters (Position 20/21) der FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne.

A) RP-HPLC Chromatogramm, $R_t = 11,7$ min (Peakflächenintegration entspricht 100 % Reinheit).

B) ESI-MS-Spektrum der FBP28-D15N (4-34) WW-Domäne, Detektion des fünffach geladenen Produkts (Hauptpeak),
 Masse (berechnet) = 3741,76 g/mol Masse (gefunden) = m/z 749,34 $[M+5H]^{5+}$ (entspricht 3741,70 g/mol)

Es stellt sich die Frage nach der Ursache des Zusammenbruchs der Struktur der Domäne nach Wegnahme von nur einer Wasserstoffbrücke. Die Erklärung ergibt sich aus der Bindung selbst. Die Amidbindung weist einen mesomeriestabilisierten Doppelbindungscharakter auf, der diese Bindung relativ starr macht. Diese Quasi-sp²-Hybridisierung in der Bindung wird durch den Wegfall des Carbonylsauerstoffs zu einer sp³-Hybridisierung. Damit wird die Bindung zwischen dem Stickstoff und dem ehemaligen Carbonylkohlenstoff frei drehbar. Dies wiederum ist der Grund für den Zusammenbruch der Struktur, da das Tyrosin 20 in beiden Varianten betroffen ist und, wie bereits oben ausführlich dargestellt, entscheidend für die Erhaltung der Struktur ist. Die freie Drehbarkeit der Bindung scheint auszureichen, um den hydrophoben Cluster auf der konkaven Seite aufzubrechen und damit die Gesamtstruktur zu zerstören. Dies wiederum erklärt, dass beide Varianten den Liganden nicht binden.

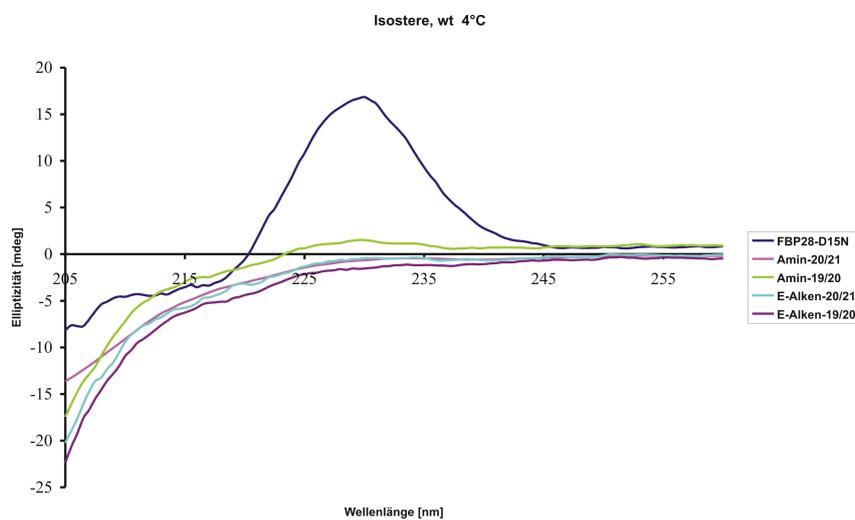


Abbildung 6.37: CD-Spektren der FBP28-D15N (4-37) WW-Domänenvarianten mit Rückgratmutationen.

Als Vergleichsspektrum dient das der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne. Dieses zeigt eine typische Kurve mit einem positiven Maximum bei 230 nm. Alle Isostervarianten zeigen nicht diesen Kurvenverlauf und sind daher nicht wie eine WW-Domäne gefaltet.

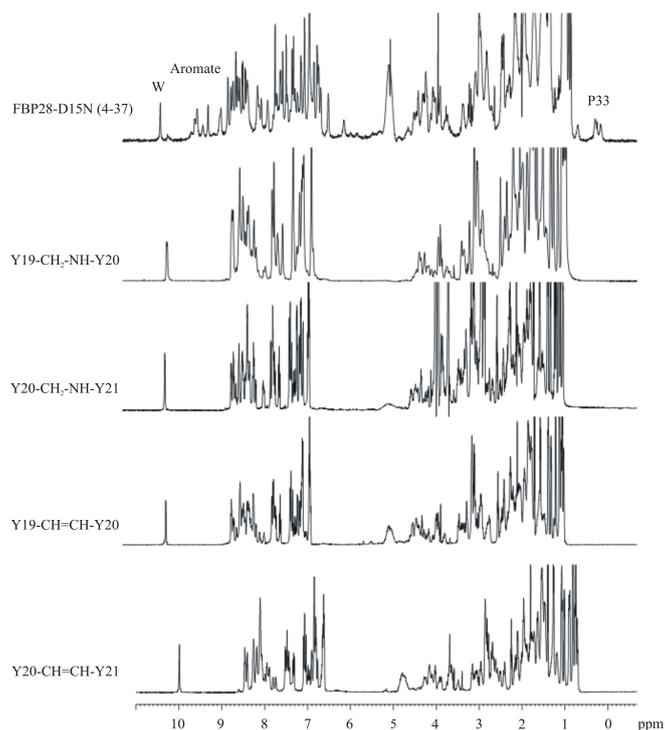


Abbildung 6.38: NMR-Spektren der FBP28-D15N (4-37) WW-Domänenvarianten mit Rückgratmutationen. Als Vergleichsspektrum dient das der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne. Hier sind die Aromatensignale und das des Pro33 gut aufgelöst und kennzeichnen so eine gut gefaltete WW-Domäne. Zudem ist die Basislinie nicht so gerade wie bei den ungefalteten Isostervarianten. Auf Grundlage dieser Kriterien sind alle Isostervarianten ungefaltet.

Um zu verhindern, dass die Bindung frei drehbar ist, wurde eine Doppelbindung eingeführt (Abbildung 6.34). Dazu wurden Tyr-E-Alken-Tyr-Isostere hergestellt [133]. Hierdurch wurden zwei Möglichkeiten zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen verhindert, die grundsätzliche Starrheit der Amidbindung bleibt jedoch erhalten. Die Synthese der E-Alken-Mutanten erfolgte wie die der Amin-Methylen-Isostere (Tabelle 6.8, Abbildungen 6.39 und 6.40). Auch diese wurden biophysikalisch untersucht.

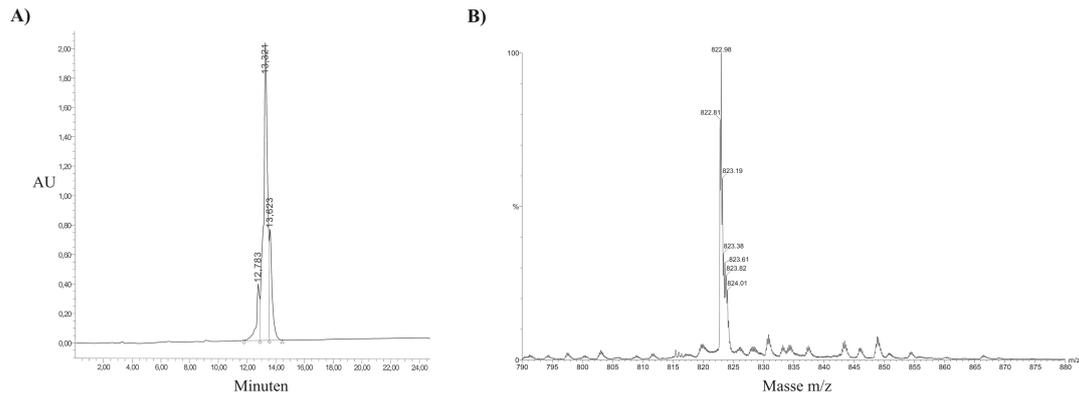


Abbildung 6.39: Analyse der mit SPPS synthetisierten E-Alken-Isosters (Position 19/20) der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne.

A) RP-HPLC Chromatogramm des Analyten, Hauptpeak $R_t = 13,3$ min, Peakflächenintegration entspricht einer Reinheit von 64 %

B) ESI-MS-Spektrum der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne, Detektion des fünffach geladenen Produkts (Hauptpeak), Masse (berechnet) = 4108,99 g/mol Masse (gefunden) = m/z 822,81 $[M+5H]^{5+}$ (entspricht 4109,05 g/mol)

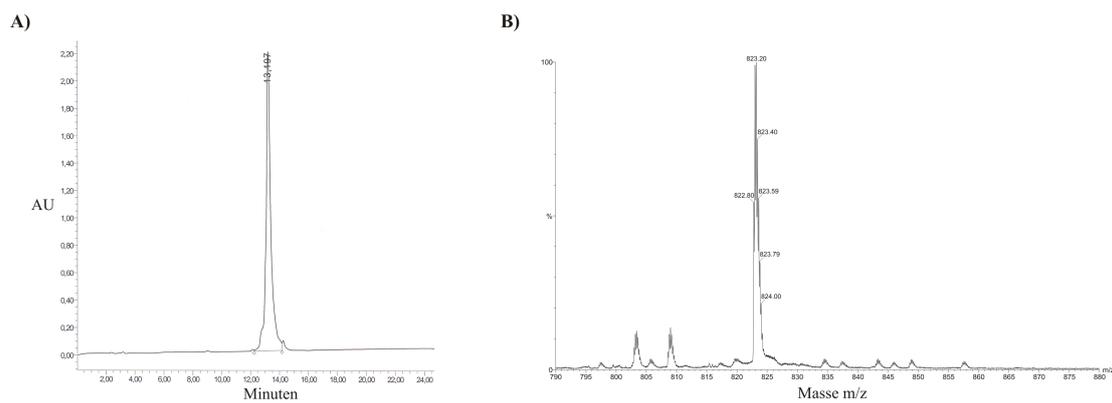


Abbildung 6.40: Analyse der mit SPPS synthetisierten E-Alken-Isosters (Position 20/21) der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne.

A) RP-HPLC Chromatogramm des Analyten, $R_t = 13,2$ min, Peakflächenintegration entspricht einer Reinheit von 100 %.

B) ESI-MS-Spektrum der FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne, Detektion des fünffach geladenen Produkts (Hauptpeak), Masse (berechnet) = 4108,99 g/mol Masse (gefunden) = m/z 822,80 $[M+5H]^{5+}$ (entspricht 4109,00 g/mol)

Die E-Alken-Varianten zeigen ähnliche NMR-Spektren wie die Methylenamin-Varianten (Abbildung 6.38). Sie besitzen eine gewisse Ordnung, erkennbar anhand der aufgelösten Peaks, die Aromaten sind dagegen frei beweglich (keine Aromatenpeaks im Vergleich zur FBP28-D15N (4-37) WW-Domäne). Zudem ist bei beiden der Pro33-Peak ebenfalls nicht aufgelöst. Auch hieraus kann man schließen, dass keine stabile Faltung möglich ist. Gleichzeitig zeigt das CD-Spektrum der E-Alken-Isostervarianten (Abbildung 6.37) keinen typischen Kurvenverlauf für eine WW-Domäne. Beide E-Alken-Isostervarianten der FBP28-D15N WW-Domäne sind somit nicht gefaltet. Eine Bindung an den Liganden PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP (Messung mit SPR) konnte, ebenso wie eine ligandeninduzierte Faltung, nicht gezeigt werden. Als Grund dafür lassen sich einige Möglichkeiten anführen. Zum einen ist die orthogonale Anordnung der AS-Reste Trp8, Tyr20 und Pro33 durch die räumliche Ausrichtung der Doppelbindung in Vergleich zur Aminbindung minimal gestört. Dies reicht bereits aus, um die Gesamtstruktur zu zerstören. Gleichzeitig kann durch die Starrheit der Doppelbindung ein Hindrehen des Tyr20 in die nötige orthogonale Lage zum Trp8 und Pro33 verhindert sein. Zum anderen wäre das Fehlen der zwei Wasserstoffbrückenbindungen im Zentrum der Domäne anzuführen, woraus eine so große Instabilität resultiert, dass ein Zusammenbruch der Faltung die Folge ist.

Alle Untersuchungen der Mutanten, die eine Veränderung im Rückgrat haben, bestätigen, dass die Wasserstoffbrückenbindungen im Zentrum der Domäne essenziell sind. Bei einer Veränderung im Rückgrat reichen die Wechselwirkungen der Seitenketten in diesem β -Faltblatt für eine Faltung nicht aus. Die Untersuchungen von Deechonkit et al. [96] an der PIN1 WW-Domäne zeigten eine Denaturierung durch eine Esterbindung zwischen Val22 und Tyr23 (entspricht Thr18 und Tyr19 für die FBP28) und zwischen Tyr24 und Phe25 (entspricht Tyr20 und Tyr21 für die FBP28). Wie bei dem Amin-Isoster Tyr20Tyr21 ist keine Faltung vorhanden.