

Zusammenfassung und Ausblick

Bei der Regulation der Dynamik des Aktincytoskeletts spielt das Protein VASP eine wichtige Rolle. Es verhindert das Capping (Wachstumshemmung) der Aktinfilamente. Dieser Vorgang spielt bei Formänderungen und Migration von Zellen eine wesentliche Rolle.

Weiterhin wird VASP bei Infektionen mit dem pathogenen Bakterium *Listeria monocytogenes* an dessen Oberfläche rekrutiert. Das ermöglicht es *Listeria*, Aktinfilamente zu polymerisieren und sich so durch die Zelle fortzubewegen. Diese Wechselwirkung wird über das Protein ActA an der Oberfläche von *Listeria* vermittelt, welches das Motiv SFEFPPPTEDEL enthält.

VASP ist ein Protein ohne katalytische Untereinheiten, das verschiedene Protein-Protein-Wechselwirkungen eingeht. Diese werden von der N-terminalen EVH1-Domäne, einem prolinreichen Mittelteil und einer darauffolgenden F-Aktin bindenden Domäne geformt. Über eine C-terminale coiled coil EVH2-Domäne oligomerisiert VASP. Ziel dieser Arbeit war ein strukturelles Verständnis der Faktoren, die zur Funktion von VASP beitragen, und die Entwicklung von Wegen zu deren Beeinflussung. Das Hauptgewicht lag auf der Untersuchung der EVH1-Domäne, für die kompetitive Liganden mit nicht-natürlichen Aminosäuren entwickelt wurden. Diese erlauben eine Erweiterung des Strukturrepertoires gegenüber natürlichen Aminosäuren und sind *in vivo* weniger anfällig für einen proteolytischen Abbau.

Die Wechselwirkung von VASP mit prolinreichen Motiven, wie sie etwa in ActA vorliegen, wird über die N-terminale EVH1 Domäne vermittelt. Sie bindet Sequenzen des Typs FPx ϕ P. Es hat sich als unmöglich herausgestellt, die beiden Proline dieser Sequenz durch andere, natürliche Aminosäuren zu ersetzen. Die einzige Substitution, die zu einem Liganden höherer Affinität führt, ist SFEWPPPTEDEL. In der vorliegenden Arbeit wurden neue Liganden für die humane VASP EVH1-Domäne auf der Basis von Peptoidbausteinen entwickelt. Diese Bausteine sind von der seltenen Aminosäure Sarcosin abgeleitet. Sie tragen an C α zwei Wasserstoffatome und eine Seitenkette am Stickstoffatom. Ausgehend von dem Peptid SFEFPPPTEDEL konnte durch ein Screening und anschließende modellunterstützte Optimierung der Strukturen ein neuer Ligand entwickelt werden, in dem sowohl der erste Prolinrest als auch der vorangehende Phenylalaninrest ersetzt wurden. Das Peptomer mit der Sequenz SFEAXPPPTEDEL (X: Peptoidbaustein) hat zwar eine geringere Affinität für die

VASP EVH1-Domäne im Vergleich zum Ausgangsliganden, belegt aber den Wert der Methode für die Entwicklung von Liganden für EVH1-Domänen.

Um ein besseres Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehung der EVH1-Domänen zu erlangen, ist die Untersuchung homologer Domänen hilfreich. Daher wurde die Struktur der sequenzhomologen EVH1-Domäne aus dem humanen Protein Spred2 aufgeklärt. Die Struktur bestätigte die Annahme aus dem Sequenzvergleich, dass es sich in der Tat um eine EVH1-Domäne handelt. Ein Vergleich der möglichen Bindestelle dieser Domäne mit der Bindestelle bekannter EVH1-Domänen deutet darauf hin, dass die Spred2 EVH1-Domäne eine andere Ligandenspezifität hat. Interaktionspartner für diese Domäne wurden bisher nicht beschrieben.

Die Affinitäten von EVH1-Domänen zu ihren Bindungspartnern sind niedrig, daher spielt die beobachtete Oligomerisierung von VASP eine Rolle zur Steigerung der Bindung an Zielproteine. Aus diesem Grund wurde die C-terminale EVH2-Domäne von VASP als modulierender Faktor untersucht.

Durch die Kombination von Analytischer Ultrazentrifugation und NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Domäne über einen weiten Konzentrationsbereich (0,0625 - 5,0 mM) als paralleles Tetramer vorliegt. Diese Anordnung ist wesentlich für die Entwicklung von Modellen zur Funktion des Proteins VASP und insbesondere der Wechselwirkung seiner EVH1-Domäne mit anderen Proteinen.

Aufgrund der hohen Symmetrie der coiled coil Domäne konnte ihre Gesamtstruktur durch NMR-Spektroskopie bisher nicht aufgeklärt werden. Auf der Basis der vorliegenden Daten aus NOESY-Experimenten und der Auswertung von Residualen Dipolaren Kopplungen wurde ein Modell des Monomers berechnet, das recht gut mit der in der Zwischenzeit aufgeklärten Kristallstruktur des Tetramers übereinstimmt.