

**Synthese, Charakterisierung und Faltungsverhalten
von kleinen, modular aufgebauten Proteinen am
Beispiel WW-Domänen funktionalisierter Coiled Coils**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom Chemikerin

ZERRIN FIDAN

aus Berlin

März, 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2008 bis März 2011 auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Dr. Rudolf Volkmer am Institut für Medizinische Immunologie der Charité Berlin in der Arbeitsgruppe „Molekulare Bibliotheken“ angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Beate Koksch

2. Gutachter: Dr. Rudolf Volkmer

Disputation am 21. Juni 2011

canim anneme ...

Kurzzusammenfassung

Eine der wesentlichen Eigenschaften von Proteinen ist die Fähigkeit zur Faltung in eine dreidimensionale, biologisch aktive (native) Konformation, welche von der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) bestimmt wird. Bereiche innerhalb eines Proteins, die eine eigenständige, autonome Faltung (Sekundärstruktur) aufweisen werden dabei als Domänen oder Module bezeichnet und bestimmen neben der Faltungstopologie auch die Funktion eines Proteins. Während sich Protein-Interaktionsdomänen wie beispielsweise WW-Domänen durch eine spezifische Bindungsaffinität gegenüber einem Liganden auszeichnen, haben Oligomerisierungs-module (z.B. Coiled Coils) die besondere Fähigkeit zur Selbsterkennung im Sinne eines molekularen „Reißverschluss“. Da viele Proteinmodule auch im isolierten Zustand, also unabhängig von ihrer natürlichen Proteinumgebung, Faltung und Funktion bewahren, sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst kleine, mehrmodulare Proteine baukastenartig synthetisiert und anschließend zu neuartigen, multifunktionalen Proteinkomplexen kombiniert und spektroskopisch charakterisiert werden.

Im synthetischen Teil dieser Arbeit wurden zunächst verschiedene WW-Domänen und α -helikale Coiled Coils separat mittels Festphasensynthese synthetisiert, wobei erstere als Funktionsmodule und letztere als Oligomerisierungsmodule mit homo- und heteroassoziativen Eigenschaften gewählt wurden. Gemäß einem „Baukasten-Prinzip“ wurden die einzelnen Module anschließend mittels nativer chemischer Ligation (NCL) zu neuartigen Proteinen zusammenschaltet. Wie geeignete biophysikalische Untersuchungen dieser Zwei-Domänen-Proteine zeigten, bleiben sowohl die Faltung (Sekundärstruktur) als auch die Funktion der jeweiligen Module im Ligationsprodukt erhalten. Mit Hilfe der assoziativen Eigenschaften der Coiled Coil Einheiten konnte schließlich auch ein heteromerer Vier-Modul-Komplex mit definierten Eigenschaften generiert und somit das große Potential dieses modularen „Baukasten-Prinzips“ erfolgreich unter Beweis gestellt werden.

Abstract

One of the most significant features of proteins is their physical ability to fold into a three-dimensional, biologically active conformation, the native state, which is determined by the amino acid sequence (primary structure). Regions within a protein that show an individual folding (secondary structure) are called domains or modules and usually determine its overall topology and function. While protein-interaction domains such as WW-domains are characterized by a strong affinity towards certain ligands the unique self-recognition ability of various oligomerization modules (e.g. coiled coils) allow them to act as a molecular “zipper”. Since many isolated protein modules preserve their individual folding even under non-physiological conditions our goal was to synthesize tailor-made peptides in a modular fashion and combine them to novel multifunctional protein complexes.

In the synthesis part of this work several WW domains and α -helical coiled coils were at first separately synthesized on solid phase. While the former being responsible for functionality the latter were chosen as homo- and heteroassociative segments. Combination of both via native chemical ligation (NCL) then yielded novel bimodular proteins in a “building block” fashion. As subsequent biophysical studies revealed, neither the folding (secondary structure) nor the functionality of the individual domains were significantly altered upon chemical ligation. Using the self-recognizing nature of the coiled coil subunits we were furthermore able to generate a quaternary heteromeric complex with well-defined properties successfully demonstrating the great potential of this modular “building block” principle.

Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge
[θ]	mittlere molare Elliptizität pro Rest
A	Absorption
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
Aatp	4-Acetamidothiophenol
AS	Aminosäure
Äquiv.	Äquivalent/e
AU	<i>arbitrary units</i> / beliebige Einheit
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
c	Konzentration
CD	<i>circular dichroism</i> / Circulardichroismus
DCM	Dichlormethan (Methylenchlorid)
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N</i> -Dimethylformamid
Et ₂ O	Diethylether
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
GdnHCl	Guanidin Hydrochlorid
HOBt	1-Hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> / Hochdruckflüssigchromatographie
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i> / Isotherme Titrationskalorimetrie
K _D	Dissoziationskonstante
M	Molar
MALDI-ToF	<i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i> / Matrix-unterstützte Laserdesorptions/ Ionisations-Flugzeit
MS	Massenspektrometrie
MeCN	Acetonitril
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether

NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NaHPO ₃	Natriumhydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> / Magnetische Kernresonanzspektroskopie
PDB	Proteindatenbank
ppm	<i>Parts per million</i> / Teile pro Million
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat
RAM	Rink-Amid Linker
RT	Raumtemperatur
RP	<i>reversed phase</i> / Umkehrphase
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> / Festphasen-Peptidsynthese
<i>t</i>	Zeit
<i>t_r</i>	Retentionszeit
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
Trt	Trityl (= Triphenylmethyl)
wt	Wildtyp

Gencodierte Aminosäuren, die in den Synthesen verwendet werden:

<u>Aminosäure</u>	<u>Dreibuchstabencode</u>	<u>Einbuchstabencode</u>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ileu	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	iv
Abstract	v
Abkürzungsverzeichnis	vi
1. Einleitung	1
1.1. Proteindomänen als modulare und selbstorganisierende Bausteine	1
1.2. Strategien zur Synthese von modularen Proteinen	3
1.2.1. Native chemische Ligation (NCL) als Werkzeug für die modulare Synthese von Proteinen	5
1.2.2. Synthese von Peptidthioestern für die native chemische Ligation	7
1.3. Geeignete Domänen für die Synthese modular aufgebauter Proteine	8
1.3.1. Das Coiled Coil Motiv - Verwendung als Oligomerisierungsmodul	8
1.3.1.1. Der GCN4 Leucin-Zipper - Ein typisches Dimerisierungsmodul	10
1.3.2. Die WW-Domäne - Verwendung als funktionelles Proteinmodul	13
1.3.2.1. WW-Domänen des TCERG1-Transkriptionsfaktors	13
1.4. Biophysikalische Methoden zur Analyse modular aufgebauter Proteine	15
1.4.1. Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie zur Bestimmung der Sekundärstruktur von modular aufgebauten Proteinen	16
2. Zielsetzung	18
3. Ergebnisse und Diskussion	19
3.1. Konzept für die Synthese WW-Domänen funktionalisierter Coiled Coils	19
3.2. Synthese der Oligomerisierungs- und Funktionsmodule	24
3.2.1. Synthese der GCN4 Leucin-Zipper	24
3.2.2. Synthese der WW2- und WW3-Domänen	27

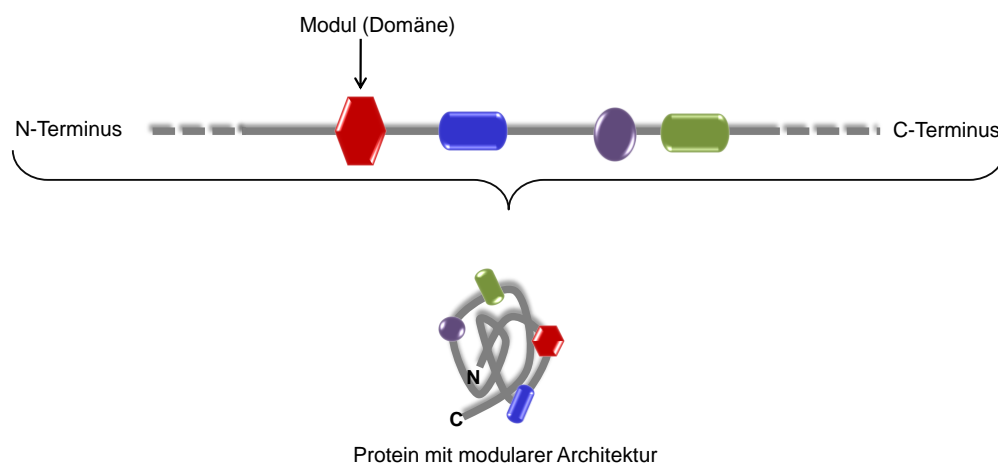
3.3. Kovalente Verknüpfung der Oligomerisierungs- und Funktionsmodule: Synthese der LZWW-Peptide durch native chemische Ligation (NCL)	32
3.3.1. Synthese des LZ3WW2-Ligationspeptids	34
3.3.2. Synthese des LZ1WW3-Ligationspeptids	36
3.4. Alternative Strategie für die Synthese des LZ1WW3-Peptids	39
3.4.1. Synthese des LZ1-Peptidthioester-Segments	41
3.4.2. Synthese des Cysteinyll-WW3-Segments	42
3.4.3. Synthese des LZ1WW3-Ligationseptids	43
3.5. Biophysikalische Charakterisierung der WW-Domänen funktionalisierten Leucin-Zipper Peptide	46
3.5.1. CD-spektroskopische Untersuchungen der LZ3-, WW2- und LZ3WW2-Peptide	47
3.5.2. NMR-spektroskopische Strukturanalyse des LZ3WW2-Peptids	51
3.5.3. Untersuchungen zur thermischen Stabilität des LZ3WW2-Peptids	53
3.5.4. Untersuchungen zur pH-abhängigen Stabilität des LZ3WW2-Peptids	56
3.5.5. Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Stabilität des LZ3WW2-Peptids	60
3.5.6. CD-spektroskopische Untersuchungen der LZ1-, WW3- und LZ1WW3-Peptide	62
3.5.7. NMR-spektroskopische Strukturanalyse des LZ1WW3-Peptids	65
3.5.8. CD-spektroskopische Untersuchungen zur Assoziation der LZWW- Peptide	66
3.5.9. NMR-spektroskopische Strukturanalyse des [LZ1WW3+LZ3WW2]- Komplexes	69
3.6. Untersuchung des [LZ1WW3+LZ3WW2]-Komplexes mittels isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	70
4. Zusammenfassung	72
5. Material und Methoden	74
5.1. Chemikalien	74
5.1.1. Geschützte Aminosäurederivate und Harze für die Peptidsynthese	75

5.2. Chemische Methoden	76
5.2.1. Automatisierte Festphasen-Peptidsynthese	76
5.2.2. Manuelle Aminosäurekupplung	77
5.2.3. Probeabsaltungen	77
5.2.4. Abspaltung der Peptide vom Harz unter Erhalt der Seitenschutzgruppen	78
5.2.5. TFA Abspaltung der Seitenschutzgruppen/Peptide vom Harz	78
5.2.6. Synthese der isolierten Leucin-Zipper Peptide	79
5.2.7. Synthese der WW-Peptide	80
5.2.8. Allgemeines Protokoll für die Synthese der C-terminalen α -Thioester Peptide	82
5.2.9. Allgemeines Protokoll für die native chemische Ligation	83
5.3. Analytische und biophysikalische Methoden	84
5.3.1. Reinigung und Charakterisierung der Peptide – Chromatographische Methoden	84
5.3.2. Massenspektrometrie	84
5.3.3. CD-Messungen	85
5.3.4. NMR-Messungen	86
5.3.5. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)-Messungen	87
6. Literaturverzeichnis	88
Danksagung	99
Lebenslauf	100
Publikationen	101

1. Einleitung

1.1. Proteindomänen als modulare und selbstorganisierende Bausteine

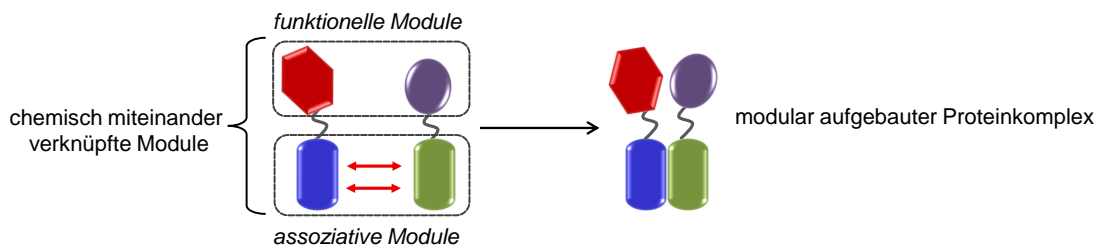
Proteine sind makromolekulare Polypeptide, die an nahezu allen intra- unter interzellulären Prozessen beteiligt sind.^[1-2] Neben Strukturproteinen (z.B. Kollagen oder Keratin) und Transport- oder Speicherproteinen (z.B. Hämoglobin) sind hier vor allem Enzyme und Hormone zu nennen, die wichtige biologische Prozesse im Organismus steuern.^[3] Entscheidend für die Funktion eines Proteins ist dabei nicht nur die Zusammensetzung der Aminosäurekette (Primärstruktur), sondern auch deren sequenzabhängige räumliche Faltung in unabhängige Bereiche, die als Domänen oder Module bezeichnet werden. Diese bilden eine kompakte Anordnung von Sekundärstrukturelementen (α -Helices, β -Faltblätter oder β -Schleifen) und sind durch komplexe Linker miteinander verbunden.^[4-7] Die vielfältige Kombination von Modulen nach einem „Baukastenprinzip“ bildet die Grundlage für den Aufbau zahlreicher Proteine mit unterschiedlichen Faltungstopologien und Funktionen. Zudem haben viele Proteinmodule die Fähigkeit, auch außerhalb des Proteins ihre definierte Sekundärstruktur einzunehmen, welche essentiell für ihre biologische Aktivität ist.^[8-12]



Schema 1. Die modulare Architektur von Proteinen (schematische Darstellung).

Neben solchen modularen Verknüpfungen spielt die Selbsterkennung (gerichtete Assoziation) von Proteinen eine elementare Rolle in zellulären Prozessen. Hierbei bewirken diverse intermolekulare hydrophobe und ionische Wechselwirkungen, dass Peptid- oder Proteinsegmente als "Reißverschluss" fungieren, welcher die Proteine an die sie kovalent gebunden sind, zusammenhält. Ein bekanntes Beispiel hierfür sind Transkriptionsfaktoren, die an bestimmte Sequenzen der DNA binden. [13]

Eine interessante Herausforderung für die Wissenschaft ist es, die Modularität und Fähigkeit zur Selbstorganisation einzelner Proteindomänen für die Konstruktion von neuartigen Proteinen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu nutzen. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Strategie besteht darin, die freie Kombinierbarkeit einzelner Module zu nutzen, um multifunktionale Proteine mit maßgeschneiderten, definierten Eigenschaften zu konzipieren. Gleichzeitig soll die Fähigkeit bestimmter Domänen zur molekularen Selbsterkennung genutzt werden, um modular aufgebaute Proteine (bestehend aus assoziativen und funktionellen Modulen) mit individuellen funktionellen Eigenschaften baukastenartig zusammenzuschalten und somit die Herstellung von multifunktional Proteinkomplexen zu ermöglichen (Schema 2).

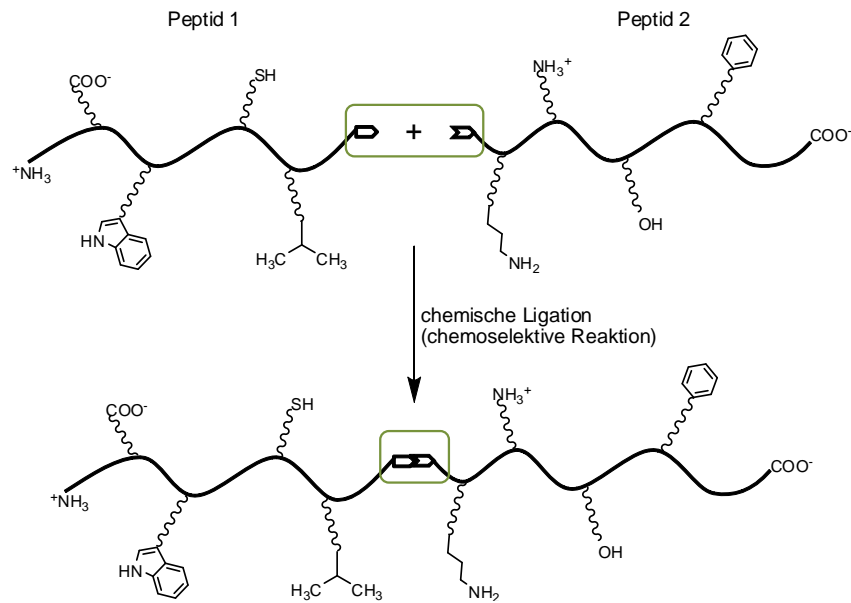


Schema 2. Modular aufgebaute Proteinkomplexe mit definierten Eigenschaften. Funktionelle und assoziative Module (Oligomerisierungsmotive) können über einen Linker miteinander verknüpft werden (hier: zu einem Zwei-Modul-Protein) und durch gerichtete Assoziation der Oligomerisierungsmotive (hier: Dimerisierungsmodule) baukastenartig zu einem Proteinkomplex mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften miteinander kombiniert werden.

Als Beispiel für die erfolgreiche Realisierung eines solchen modularen Konzepts sei hier die Entwicklung von künstlichen Antikörpern mit neuen Bindungseigenschaften^[14] oder die gerichtete Enzym-Reassemblierung genannt.^[15] Darüber hinaus spielt die modulare Synthese auch im Rahmen der synthetischen Biologie eine große Rolle, bei der durch die Zusammenführung von synthetischen und biologischen Einheiten neuartige Moleküle, Gewebe oder Zellen geschaffen werden sollen.^[16]

1.2. Strategien zur Synthese von modularen Proteinen

Für die Synthese modularer Proteine stehen mehrere Strategien zur Verfügung, wobei neben molekularbiologischen Ansätzen (Proteinexpression) auch die chemische Proteinsynthese genutzt werden kann.^[17,18] Im Gegensatz zu den alternativen rekombinanten Methoden der Proteinsynthese liegen die Vorteile der chemischen Synthese besonders in der multiplen Handhabung. So erlaubt ein hoher Grad an Automatisierung eine parallele Synthese von mehreren Peptiden in kurzer Zeit. Weiterhin können Modifikationen durch den Einsatz von proteinogenen als auch nicht-proteinogenen Aminosäuren in die Polypeptidkette erreicht werden. Für die chemische Synthese von Peptiden und Proteinen hat sich vor allem die von Merrifield entwickelte Festphasensynthese (SPPS) an einem polymeren Träger als eine sehr effektive Methode bewährt, welche mit einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie einhergeht.^[19-21] Im Hinblick auf die modulare Synthese von Proteinen können zusätzlich Ligationsmethoden genutzt werden, die es erlauben, ein Protein aus mehreren einzelnen Fragmenten zusammzusetzen.^[22-26] Besonders praktikabel und von großer Bedeutung sind vor allem chemoselektive Ligationsstrategien, die das gezielte Zusammensetzen eines Proteins aus einzelnen ungeschützten Fragmenten, wie Domänen oder Peptiden, erlauben und zu einer nativen Peptidbindung an der Verknüpfungsstelle führen (Schema 3).^[27-29] Diese haben zudem den Vorteil, dass aufgrund der chemoselektiven Reaktion zweier terminaler funktioneller Gruppen keine Schutzgruppen notwendig sind und die Ligation unter milden Bedingungen in wässrigen Lösungen durchgeführt werden kann.



Schema 3. Chemoselektive Ligation ungeschützter Fragmente.

Als eine ausgezeichnete Methode für die chemoselektive Kupplung zweier ungeschützter Peptidfragmente hat sich vor allem die native chemische Ligation (NCL) bewährt.^[30] Darüber hinaus kommt die NCL auch in Kombination mit biosynthetischen, rekombinanten Methoden, wie beispielsweise der Ligation exprimierter Proteine (EPL, *Expressed-Protein-Ligation*), zur Anwendung.^[31,32] Derartige semisynthetische Ansätze erlauben die Verknüpfung synthetischer mit rekombinanten Fragmenten, was prinzipiell den Zugang zu Proteinen unterschiedlichster Größe ermöglicht, die im Anschluss für biologische und biophysikalische Studien zur Verfügung stehen.

1.2.1. Native chemische Ligation (NCL) als Werkzeug für die modulare Synthese von Proteinen

Eine bemerkenswerte Weiterentwicklung des Ligationsprinzips nach Wieland *et al.*^[27] gelang Kent & Dawson *et al.* 1994 mit der Einführung der nativen chemischen Ligation (NCL), welche heute eine der leistungsfähigsten Methoden zur Peptidligation darstellt.^[30] Der Vorteil der NCL besteht darin, vollständig native Strukturen mittels chemischer Synthese zu konstruieren. So umfasst diese Kupplungsmethode die chemoselektive Verknüpfung zweier ungeschützter Peptidfragmente unter Bildung einer nativen Peptidbindung. Dabei findet zwischen einem C-terminalen Peptidthioester und einem zweiten Peptidfragment mit N-terminalem Cystein-Rest zunächst eine chemoselektive, reversible Umesterung statt, bei der die nukleophile Thiolgruppe des Cysteins mit dem C-terminalen Thioester des zweiten Peptidfragments reagiert. Der anschließende geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt ist die sogenannte intramolekulare S→N Umlagerung (Acyltransfer), bei der ein fünfgliedriger, zyklischer Übergangszustand unter Ausbildung einer stabilen Peptidbindung durchlaufen wird (Abb. 1). Die Chemoselektivität beruht hierbei auf der Tatsache, dass nur N-terminale Cysteine mit freier Aminogruppe einen Acyltransfer erlauben, während interne Cysteine lediglich „inaktive“ Thioester bilden, die keine Peptidbindung ausbilden können. Ein weiterer wesentlicher Vorteil der nativen chemischen Ligation liegt in der relativ einfachen Durchführung der Reaktion unter milden Bedingungen, in wässrigen Pufferlösungen und bei neutralem pH-Wert. Darüber hinaus können alle proteinogenen Aminosäuren auf C-terminaler Seite an der NCL teilnehmen, wobei die Seitengruppen der Aminosäuren am Thioester einen bedeutenden Einfluss auf die Geschwindigkeit der NCL haben. So beeinflussen sterisch anspruchsvolle Seitenketten, wie beispielsweise die der Aminosäuren Leucin, Isoleucin oder Valin, die Reaktionsgeschwindigkeit der Umesterung nachteilig.^[33] Darüber hinaus hängt die Geschwindigkeit der Umesterung auch von der Natur des Thioesterderivats ab, so dass bevorzugt Arylthioester eingesetzt werden, um einen schnellen Thiol-Thioester-Austausch gewährleisten zu können (Aryl > Alkyl).^[34,35] Ein intrinsischer Nachteil der NCL ist jedoch die Notwendigkeit für das Vorhandensein eines N-terminalen Cysteins. Um dieses Problem zu umgehen, bietet sich hier beispielsweise

die Einführung von sogenannten Auxilliaren an, die am N-Terminus eines Peptids angebracht werden und nach der Hilfsgruppen-vermittelten Ligation wieder leicht entfernt werden können.^[36]

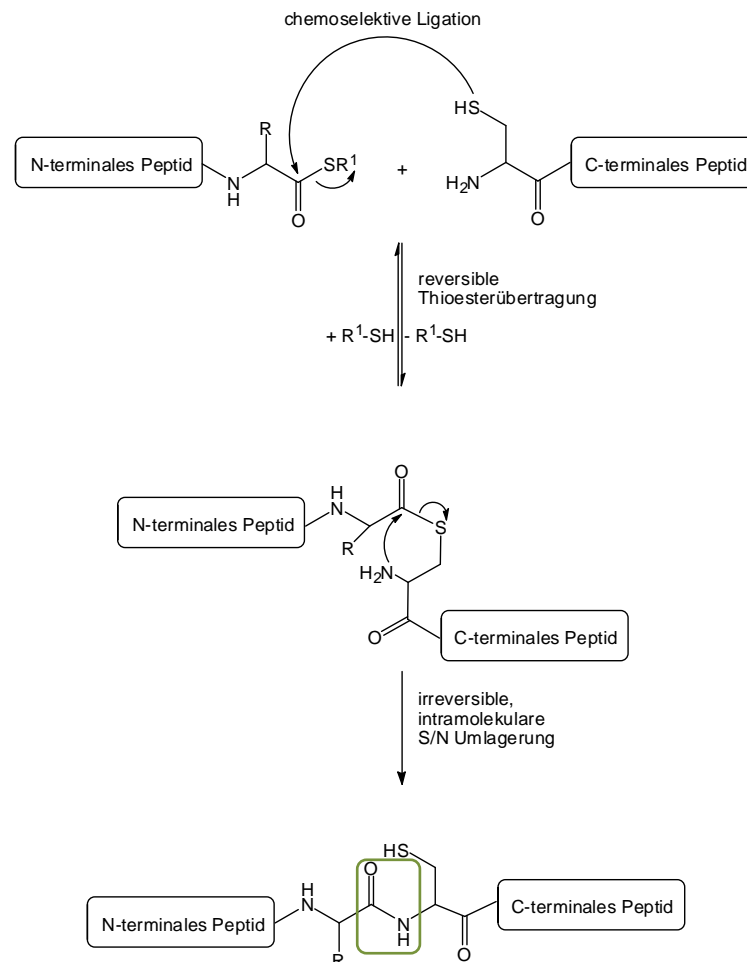


Abbildung 1. Mechanismus der nativen chemischen Ligation. (R = Seitenkette der entsprechenden Aminosäure, R¹ = Benzyl-, Phenylrest).

Insgesamt stellt die NCL jedoch ein äußerst leistungsstarkes Werkzeug zur Ligation dar und findet inzwischen eine breite Anwendung in der Proteinsynthese. Dementsprechend sollen im Rahmen dieser Arbeit Peptide in einer modularen Art und Weise zu kleinen Proteinen kombiniert werden, wobei die NCL als “Klebstoff“ für die kovalente Verknüpfung zweier Module eingesetzt werden kann.

1.2.2 Synthese von Peptidthioestern für die native chemische Ligation

Der einfache Zugang zu C-terminalen Peptidthioestern steht im Fokus vieler Bemühungen, da diese insbesondere für die NCL unverzichtbare Ausgangsmaterialien sind und damit wichtige Bestandteile für die Proteinsynthese darstellen. Für gewöhnlich werden C-terminale Peptidthioester mittels Festphasensynthese (SPPS) sowohl mit der Boc- als auch der Fmoc-Strategie hergestellt.^[37-40] Obgleich sich die Boc-SPPS-Strategie für die Thioestersynthese bewährt hat, bedarf die Abspaltung vom Harz aufgrund der stark sauren Bedingungen (Fluorwasserstoff oder Trifluormethansulfonsäure) einer speziellen Laborausrüstung. Im Gegensatz dazu wird die Fmoc-SPPS-Strategie mit milderer basischen Abspaltbedingungen für die Bildung von Peptidthioestern bevorzugt, welche allerdings durch die Basenlabilität der Thioester (Hydrolyse) eingeschränkt wird. Bekannte Beispiele für die Generierung von Peptidthioestern mittels Fmoc-SPPS sind die sogenannten „*safety catch*“-Linker.^[41,42] Dabei kommt ein Alkansulfonamid-Linker zum Einsatz, der im Anschluss an die Fmoc-SPPS mit Diazomethan^[43] oder Iodacetonitril^[44] in ein Sulfonamid überführt wird und durch anschließende Abspaltung mit nukleophilen Thiolen den α -Thioester liefert. Ein alternativer Ansatz für die Synthese von Thioestern, welcher auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde, beinhaltet die Verwendung von säurelabilen Trityl-Harzen, welche eine Abspaltung der Peptide unter leicht sauren Bedingungen und den Erhalt der Seitenschutzgruppen ermöglicht (Abb. 2).^[45] Die freie C-terminale Carboxylfunktion wird nach Aktivierung (z.B. DIC und HOBt) durch Zugabe eines geeigneten Thiols (z.B. *p*-Acetamidothiophenol) verestert. Nach Abspaltung aller Seitenschutzgruppen mit TFA wird der vollständig entschützte Peptidthioester erzeugt.

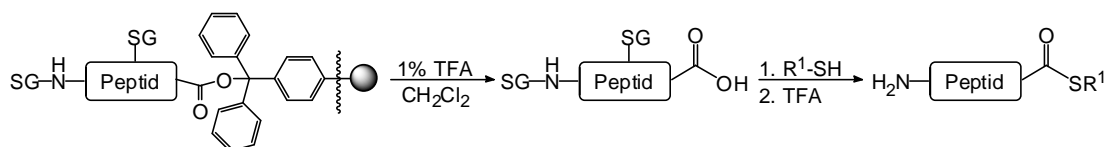


Abbildung 2. Strategie für die Synthese eines Peptidthioesters an einem Trityl-Harz. (TFA = Trifluoressigsäure, SG = Schutzgruppen der entsprechenden Aminosäuren, R¹ = Phenyl- bzw. Benzylrest).

1.3. Geeignete Domänen für die Synthese modular aufgebauter Proteine

Das Konzept der modularen Synthese maßgeschneiderter Proteine nach einem Baukasten-Modell bedarf geeigneter struktureller Einheiten (z.B. Domänen oder Sekundärstrukturelemente) mit folgenden Eigenschaften: Sie müssen eine gefaltete Konformation (Sekundärstruktur) einnehmen, die mit dem Erhalt der biologischen Aktivität (Protein-Interaktion/-Wechselwirkung) einhergeht sowie unter physiologischen Bedingungen stabil sein. Ferner sollten sie frei kombinierbar und bezüglich Struktur- und Interaktionsstudien mittels bioanalytischer Methoden (z.B. CD-Spektroskopie) leicht zu analysieren sein.

Auf der Basis von Vorarbeiten in der Gruppe „Molekulare Bibliotheken“ wurden in dieser Arbeit Coiled Coils als Oligomerisierungsmodule ausgewählt, deren Faltungseigenschaften gut untersucht sind und die sowohl eine gerichtete Assoziation ermöglichen sowie eine hohe Stabilität im isolierten Zustand aufweisen. Desweiteren wurden WW-Domänen als funktionelle Motive für die Synthese modularer Proteine ausgewählt. Diese biologisch relevanten Domänen sind synthetisch zugänglich und können unabhängig von ihrer nativen Proteinumgebung eine gefaltete β -Faltblatt-Struktur einnehmen.

1.3.1. Das Coiled Coil Motiv - Verwendung als Oligomerisierungsmodul

Das α -helikale Coiled Coil ist ein in der Natur weit verbreitetes Strukturmotiv, welches erstmals 1953 von Crick beschrieben wurde und in diversen biologisch aktiven Proteinen zu finden ist.^[46] Bestehend aus zwei oder mehreren α -helikalen Polypeptidketten, die umeinander zu einer „Superhelix“ gewunden sind, haben Coiled Coils die Eigenschaft homo- oder heteromere Assoziationsnetzwerke zu bilden.^[47] Aufgrund dieser besonderen Fähigkeit zur Selbstorganisation bzw. Selbsterkennung sind Coiled Coil Peptide geradezu prädestiniert, um funktionelle Einheiten sowie Aggregate oder Systeme zu konstruieren und folglich als Protein-Interaktionsbausteine zu fungieren.^[48]

Die Selbstorganisation ist auf ein wiederkehrendes Heptadenmuster zurückzuführen $(-a-b-c-d-e-f-g-)_n$, welches durch die Aminosäuresequenz gegeben ist (Abb. 3). Dieses Aminosäuremotiv beinhaltet unpolare Aminosäurereste an den Positionen **a** und **d** (z.B. Leucin, Isoleucin oder Valin), die ineinander greifen („knobs-into-holes“) und eine amphipathische Helix mit einem hydrophoben Kern ausbilden, was die Triebkraft für die Stabilität des Coiled Coil Faltungsmotivs darstellt.^[49] Die restlichen Positionen **b**, **c** und **f** sind überwiegend hydrophil, wobei die Positionen **e** und **g** mit geladenen Aminosäureresten (z.B. Glutaminsäure und Lysin) besetzt sind und durch die Bildung von nichtkovalenten inter- und intrahelikalen Wechselwirkungen (wie z.B. Salzbrücken) zur Spezifität der Bindung beitragen.^[50]

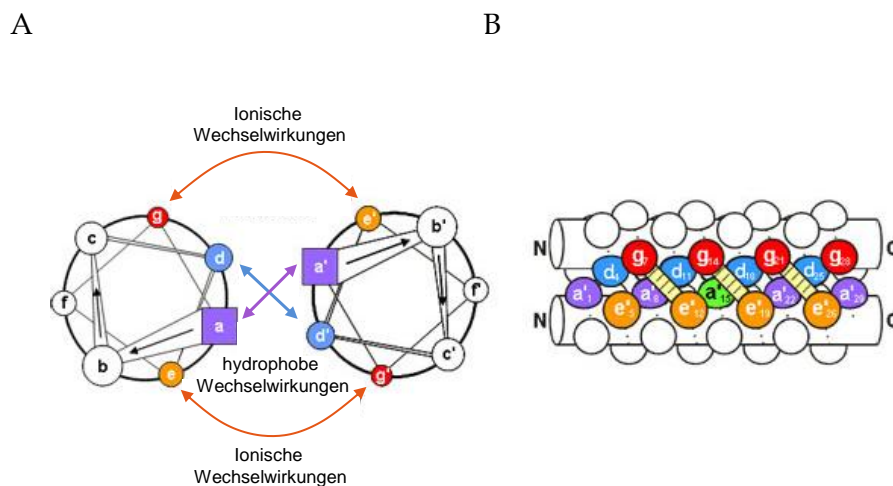


Abbildung 3. Dimeres paralleles Coiled Coil. **A.** Helixrad-Diagramm eines homodimeren Coiled Coils, welches die sich wiederholenden Sequenzeinheiten von sieben Aminosäuren („heptad repeat“) mit den Positionen a bis g (bzw. a' bis g') darstellt. **B.** Seitenansicht des parallelen Coiled Coils. Das Helixgerüst wird durch die beiden Zylinder und die Aminosäurepositionen a bis g (bzw. a' bis g') durch Kreise visualisiert. (Die Abbildungen sind der Publikation von Arndt *et al.*^[50] entnommen).

Darüber hinaus werden der Oligomerisierungszustand (Homomer, Heteromer etc.), die Bindungsrichtung (parallel oder anti-parallel) sowie die Länge und die Stabilität durch die Aminosäuresequenz bestimmt.^[51] Die molekulare Erkennung von Coiled Coils ermöglicht die nichtkovalente Bindung von Biomolekülen oder Strukturen.

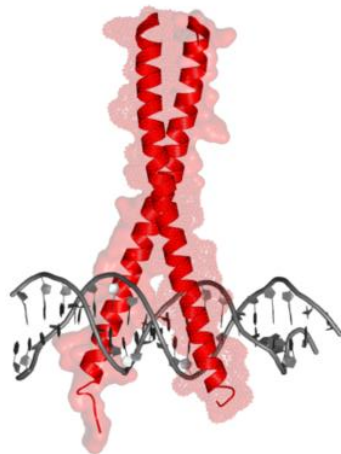
In der Natur fungieren Coiled Coils u.a. in Biomolekülen als Proteinbinder von Zellbestandteilen (z.B. Bildung von Signaltransduktionskomplexen und Transkriptionsfaktoren),^[52] strukturelle Abstandhalter (z.B. Separierung von Zellwänden und Membranen),^[53] Vermittler von Membranfusionen (SNARE Proteinkomplexe)^[54] sowie als dynamische Module (z.B. Motorproteine).^[55] Diese unterschiedlichen Funktionen hat sich die biochemische Forschung zu Nutzen gemacht, um Coiled Coil basierte Grundeinheiten mit diversen anderen (biologischen) Komponenten zu funktionellen Systemen zu kombinieren. So setzten beispielsweise Jiang *et al.* die Selbstorganisation von Coiled Coils für ihre Studien ein, um das Assoziationsverhalten von α -Synuclein zu untersuchen.^[56] Desweiteren konnten Boato *et al.* synthetische, virusartige Partikel mittels Coiled Coil Assoziationen generieren.^[57] Neben dem Phänomen der molekularen Selbsterkennung bietet sich das Coiled Coil Motiv zusätzlich wegen seiner kontrollierbaren Merkmale und Variabilität als Baustein für die Synthese an. Die wichtigsten Eigenschaften sind dabei die festgelegte Form und Größe, die sich aus dem Heptadenmuster ergebende Stabilität und Vielfalt der Strukturen und Funktionen, die direkte Sequenz-Struktur Abhängigkeit und schließlich die Möglichkeit zur Funktionalisierung am C- und N-Terminus. Basierend auf Coiled Coil Interaktionen besteht eine besondere Herausforderung in der Synthese von Proteinen mit individuellen Funktionen, welche sich auf gewünschte Art und Weise in einem Oligomerisierungskomplex kombinieren lassen können. Damit eröffnen sich neue Wege, natürliche Prozesse zu verstehen und zu modifizieren, mit dem Ziel, multifunktionelle Systeme zu erzeugen, welche biologische Prozesse im Organismus zielgerichtet beeinflussen können.

1.3.1.1. Der GCN4 Leucin-Zipper - Ein typisches Dimerisierungsmodul

Ein populärer und umfassend charakterisierter Coiled Coil Vertreter aus der Familie der bZip-(*basic region leucine zipper*)-Transkriptionsfaktoren ist die GCN4 (*general control protein*)-Domäne, die für die Aktivierung von mehr als 30 Genen in der Aminosäure-Biosynthese verantwortlich ist.^[58] Das gesamte GCN4-Protein umfasst 281 Aminosäuren und setzt sich aus der Leucin-Zipper Domäne und einem DNA bindenden, basischen Motiv zusammen.

Bei der Leucin-Zipper Domäne handelt es sich um ein Dimerisierungsmodul, bestehend aus zwei 33 Aminosäure langen α -Helices, die sich wie eine Art Reißverschluss (*zipper* engl. Reißverschluss) ineinander fügen und so an die basischen Motive in der DNA Sequenz binden (Abb. 4, A). Dabei ragen die Leucinreste des einen Proteins der α -Helix heraus und bilden mit den Leucinresten des anderen Proteins eine Coiled Coil Domäne.^[59] Die Interaktion beider Helices folgt dem „Crick Prinzip“, wobei die Aminosäuren in **a** und **d** Positionen den hydrophoben Kern ausbilden, während die benachbarten Aminosäuren in **e** und **g** Positionen durch Ausbildung von Salzbrücken zur inter- und intramolekularen Stabilität und Spezifität beitragen.^[60] Die **d** Positionen sind ausschließlich von Leucin besetzt, während die **a** Positionen von Valin besetzt werden (Abb. 4, B). Somit kommt es zur Ausbildung hydrophober Kontaktflächen. Jedoch ist die Position **a** in der dritten Heptade mit der polaren Aminosäure Asparagin besetzt, deren Relevanz für die Dimerisierungsvorgänge mit Hilfe verschiedener Untersuchungen belegt wurde.^[61] O’Shea *et al.* konnten 1989 zusätzlich die parallele Orientierung beider Helices nachweisen.^[62]

A



B

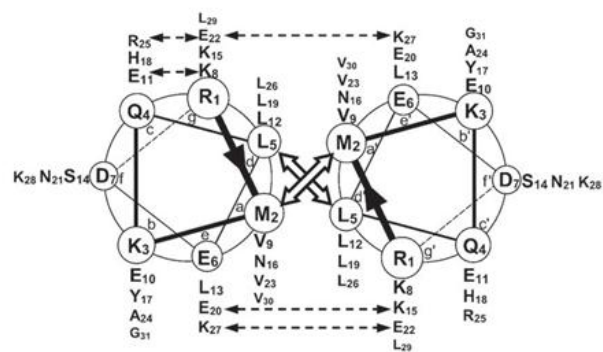


Abbildung 4. Der GCN4 Leucin-Zipper. **A.** Homodimere bZIP-Domäne des Transkriptionsfaktors GCN4 Leucin-Zipper assoziiert an DNA (Die Abbildungsdaten sind der PDB: 1YSA entnommen).^[63] **B.** Helixrad-Darstellung des GCN4 Leucin-Zippers. Die überkreuzten Pfeile repräsentieren die hydrophoben Interaktionen zwischen beiden Helices und die gestrichelten Pfeile inter- und intramolekulare Salzbrücken.

Aufgrund seiner gut aufgelösten Kristallstruktur stellt das GCN4-Protein ein ideales Forschungsmodell für Coiled Coil Untersuchungen mit unterschiedlichen Ansätzen dar. So untersuchten Portwich *et al.* die homo- und heterospezifischen Assoziations-eigenschaften der Leucin-Zipper Domäne des GCN4-Proteins auf der Grundlage der SPOT-Technologie auf Zellulose-Membranen.^[64] In diesem Zusammenhang wurden die Einflüsse von Aminosäuresubstitutionen auf die Assoziation analysiert und die Stöchiometrien mittels biophysikalischer Methoden überprüft. Ausgehend vom natürlich vorkommenden Leucin-Zipper Wildtyp wurden Substitutionsanalysen auf Aminosäureebene durchgeführt, wobei bestimmte Aminosäuren im Wildtyp-Peptid jeweils gegen jede natürliche Aminosäure ausgetauscht und auf eine Zellulose-Membran gespottet („Festphasen-screening“) wurden. Durch einen derartigen Austausch von mehreren Aminosäuren konnte ein Wechsel von homomeren Coiled Coil Strukturen zu heteromeren Strukturen herbeigeführt werden.^[65] Dementsprechend resultierten u.a. zwei synthetische GCN4-Varianten, die sich in ihren homo- und heterospezifischen Assoziationseigenschaften unterscheiden (Abb. 5). Im Gegensatz zur Variante 1 (LZ1), die alleine weder homo- noch heteroassoziatives Verhalten zeigt, bildet die synthetische GCN4 Leucin-Zipper Variante 3 (LZ3) eine homospezifische Coiled Coil-Assoziation zum Homotrimer. Dagegen wurden zwischen LZ1 und LZ3 Assoziationen zu Heterodimeren beobachtet (Abb. 5).

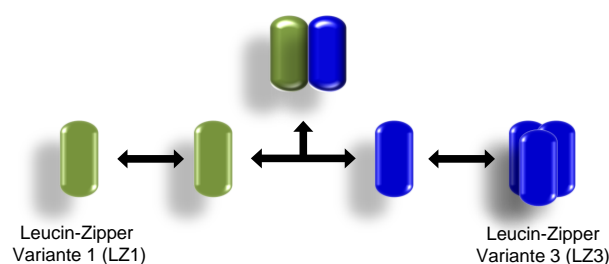


Abbildung 5. Assoziationsnetzwerk der synthetischen GCN4 Leucin-Zipper Varianten. Dargestellt sind die synthetischen GCN4 Leucin-Zipper Varianten LZ1 und LZ3, die durch Aminosäuresubstitutionen und Doppelaustausche mittels SPOT-Technologie erhalten wurden.^[64]

Hinsichtlich der Synthese modular aufgebauter, kleiner Proteine sollen die Leucin-Zipper Varianten LZ1 und LZ3 im Rahmen dieser Arbeit als Oligomerisierungsmodule eingesetzt werden, da auf diese Weise gerichtete Selbstorganisationen zu heteromeren Coiled Coils genutzt und kontrolliert werden können.

1.3.2. Die WW-Domäne - Verwendung als funktionelles Proteinmodul

Obgleich WW-Domänen zu den kleinsten in der Natur vorkommenden Protein-Protein-Interaktionsmodulen gehören, spielen sie eine wesentliche Rolle in biochemischen Vorgängen, wie z.B. in Signaltransduktionsprozessen, als Co-Aktivatoren während der Transkription und in der RNA Prozessierung.^[66-69] Ferner sind WW-Domänen vermittelte Komplexe an diversen Krankheiten wie beispielsweise Alzheimer und Chorea Huntington beteiligt.^[70-72] Diese bis zu 40 Aminosäuren langen Proteinmodule besitzen die Fähigkeit, prolinreiche Peptidmotive und phosphorylierte Tyrosin-, Serin- bzw. Threonin-Liganden zu binden.^[73,74] Zusätzlich erkennen einige Interaktionsmodule ihre Tandemliganden, welche durch räumliche Nähe untereinander Faltung induzieren können (Tandem WW-Domänen).^[75-77] Die Sekundärstruktur der WW-Domäne wird durch ein drei-strängiges, antiparalleles β -Faltblatt bestimmt.^[68,78] Charakteristisch und gleichzeitig namensgebend sind die beiden hochkonservierten Tryptophane (W), die 20 bis 22 Aminosäuren voneinander entfernt liegen. Unabhängig von ihrer natürlichen Proteinumgebung ist die WW-Domäne in der Regel auch im isolierten Zustand in der Lage, ihre Sekundärstruktur einzunehmen und ist insofern als Modellsystem für Faltungs- und Stabilitätsuntersuchungen prädestiniert.

1.3.2.1. WW-Domänen des TCERG1-Transkriptionsfaktors

Der menschliche Transkriptions-Elongations-Regulator 1 (TCERG1), auch bekannt als das CA150-Protein, wurde in Neuronen des Gehirns und außerdem in höheren Konzentrationen auch im Hirngewebe von Patienten mit dem Chorea Huntington Syndrom gefunden.^[79] Bestehend aus 1098 Aminosäuren, umfasst das TCERG1-Protein sechs FF- und drei WW-Domänen (Abb. 6, A), welche die modulare Architektur des Transkriptionsfaktors bilden, und bindet über diese u.a. an die RNA Polymerase II und prolinreiche Sequenzen.^[80] Die Assoziation von WW-Domänen mit Krankheiten (wie z.B. Alzheimer und Chorea Huntington) prädestiniert diese Domänen für Wissenschaft und Forschung als bevorzugte Untersuchungsmodelle, um die zu Grunde liegenden biologischen Mechanismen aufzuklären und gegebenenfalls nachhaltig zu beeinflussen.

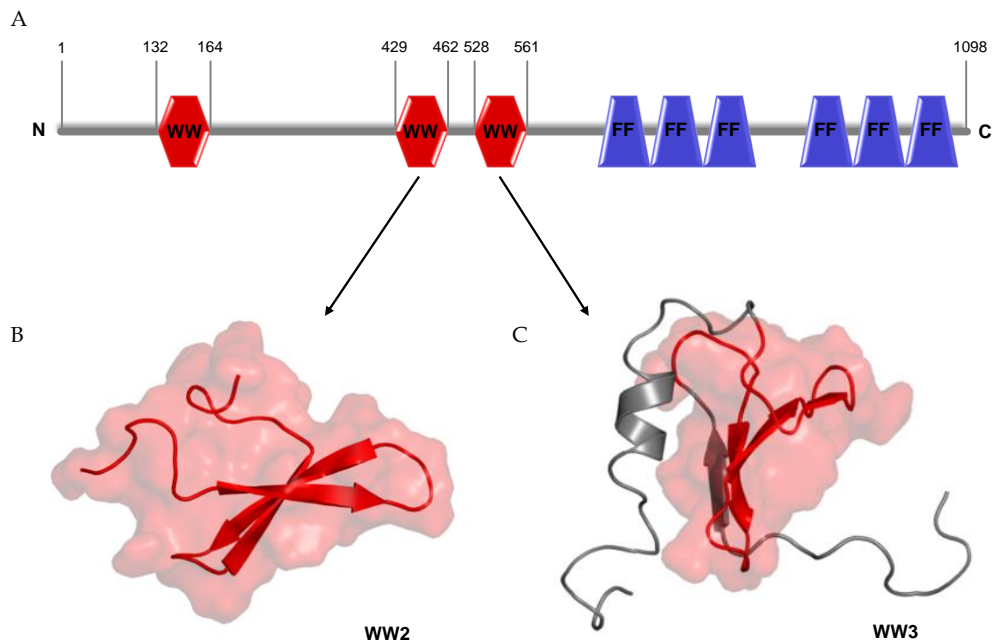


Abbildung 6. Aufbau des menschlichen Transkriptions-Elongations-Regulators TCERG1. **A.** Schematische Darstellung des im Nukleus lokalisierten TCERG1-Proteins (UniProtKB/Swiss-Prot: O14776), welches sechs FF- und drei WW Domänen enthält: WW1 (132-164), WW2 (429-462) und WW3 (528-561). Die WW-Domänen des TCERG1-Proteins fungieren als Co-Aktivatoren während der Transkription im Nukleus.^[69] **B.** NMR-Struktur der zweiten WW-Domäne (PDB: 1E0L)^[78]. Dargestellt ist die antiparallele, dreisträngige β -Faltblatt Struktur. **C.** NMR-Struktur der dritten WW-Domäne (PDB: 2DK7)^[81]. Diese enthält neben dem, für WW-Domänen, typischen β -Faltblatt-Motiv auch eine kurze α -Helix in Richtung C-Terminus.

In der Arbeitsgruppe „Molekulare Bibliotheken“ wurden die verschiedenen WW-Domänen, insbesondere die WW2-Domäne (auch FBP28-Domäne genannt), des TCERG1-Transkriptionsfaktors hinsichtlich ihrer Eigenschaften wie Faltung, Stabilität und Bindungsverhalten untersucht.^[82] Während die WW2-Domäne (Abb. 6, B) aufgrund ihrer Stabilität im isolierten Zustand als ein geeignetes Untersuchungsmodell für Faltungs- und Ligandenbindungsstudien genutzt wurde, konnten Otte *et al.* für die isolierte WW3-Domäne (Abb. 6, C) weder eine korrekte Faltung noch eine Bindung an ein spezifisches Ligandenmotiv beobachten.^[83] Für die Synthese der WW3-Domäne wählten Otte *et al.* jedoch nur den Sequenzabschnitt einschließlich der β -Faltblattregionen aus. Der kurze α -helikale Abschnitt wurde nicht in die zu synthetisierende Sequenz mit einbezogen (vgl. Abb. 6, C).

Dies führt zu der Annahme, dass die C-terminale, kurze α -Helix möglicherweise zur Stabilisierung der WW3-Domäne und somit zur Ausbildung einer definierten Konformation beiträgt.

Angesichts der vorhandenen experimentellen und theoretischen Expertise wurde in der vorliegenden Arbeit im Rahmen der Synthese kleiner, modularer Proteine mit definierten Eigenschaften die WW2-Domäne zur Funktionalisierung der Leucin-Zipper ausgewählt. Ferner wurde mit Hilfe der im isolierten Zustand ungefalteten WW3-Domäne überprüft, ob eine modulare Verknüpfung mit einem α -helikalen Motiv, wie dem Leucin-Zipper, zu einer Stabilisierung der β -Faltblattstruktur und folglich zu einer Faltungsinduktion führt. Zusätzlich wurde das Faltungs- und Stabilitätsverhalten dieser, im Coiled Coil-Proteinmodul kovalent gebundenen WW-Domänen, mit dem der isolierten WW-Domänen (Referenzstruktur) verglichen.

1.4. Biophysikalische Methoden zur Analyse modular aufgebauter Proteine

Heutzutage erlauben es verschiedene biophysikalische Untersuchungsmethoden, wie beispielsweise NMR- und CD-Spektroskopie, die Struktur von kleinen organischen Molekülen bis hin zu komplexen Proteinen aufzuklären. Zusätzlich können kalorimetrische Methoden wie die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) genutzt werden, um Protein-Protein- bzw. Protein-Ligand-Wechselwirkungen zu untersuchen. Für die Analyse der strukturellen Eigenschaften wie Faltung, Stabilität und Ligandenbindung der modular aufgebauten Zwei-Domänen-Proteine (WW-Domänen und Coiled Coils) sollen diese Verfahren zum Einsatz kommen. Während in dieser Arbeit hauptsächlich die CD-Spektroskopie zur Untersuchung der Sekundärstruktur der Peptide angewendet werden soll, können die Faltungszustände der WW-Domänen in den WW-Leucin-Zipper-Konstrukten u.a. mit Hilfe von ^1H -NMR-Spektroskopie anhand charakteristischer Signalmuster bestimmt werden. Weiterhin können mit Hilfe von ITC-Messungen thermodynamische Parameter bezüglich der Selbstassoziation der Coiled Coils sowie der WW-Domänen mit den entsprechenden Liganden ermittelt werden.

1.4.1. Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie zur Bestimmung der Sekundärstruktur von modular aufgebauten Proteinen

Eine Variante der Absorptionsspektroskopie, die eine hervorragende Untersuchungsmethode zur schnellen Bestimmung der sekundären Struktur und Faltung von Proteinen darstellt, ist die sogenannte Circular dichroismus-(CD)-Spektroskopie.^[84] Chirale Moleküle sind optisch aktiv, wobei die unterschiedliche Absorption von links- und rechts zirkular polarisiertem Licht an chiralen Zentren eines Moleküls als Circular dichroismus bezeichnet wird.^[85] Aufgrund ihrer Zusammensetzung aus chiralen, optisch aktiven Aminosäuren tragen Peptide und Proteine wesentlich zum Circular dichroismus bei und eignen sich folglich als Analyten für CD-spektroskopische Untersuchungen. Neben den Chromophoren des Peptidrückgrats können auch aromatische Reste in den Seitenketten der Aminosäuren zum Circular dichroismus beitragen. Ein charakteristischer Spektralbereich zur Bestimmung der Sekundärstruktur ist dabei die Fern-UV-Region von 170 bis 250 nm. In diesem Bereich werden die Absorptionsbanden durch die $n \rightarrow \pi^*$ und $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge der peptidischen Amidgruppen dominiert, woraus charakteristische CD-Spektren für die jeweiligen Sekundärstrukturelemente resultieren (Abb. 7).^[86,87] Das Fern-UV CD-Spektrum einer α -Helix ist durch eine positive Bande bei 192 nm und durch zwei negative Minima bei 208 und 222 nm charakterisiert. Erwartungsgemäß zeigen Coiled Coils in CD-Experimenten ebenfalls die typischen Signale für α -Helices. Während die Absorptionsbanden um 222 nm ($n \rightarrow \pi^*$ -Übergang) Hinweise über den α -helikalen Gehalt geben, ist die bei 208 nm gelegene Absorptionsbande ($\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang) ein Merkmal dafür, dass die Helix einzel- oder wie in Coiled Coils mehrsträngig vorliegt.^[88] Zusätzlich liefert das Elliptizitätsverhältnis der beiden Minima ($[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$) Hinweise auf den Oligomerisierungsgrad und wird für Coiled Coils allgemein als ≥ 1 und für isolierte Helices als $\leq 0,86$ beschrieben.^[89] Im Gegensatz zu helikalen Strukturen ist das CD-Spektrum eines antiparallelen β -Faltblatts durch eine positive Absorptionsbande bei 195 nm und ein negatives Signal bei 218 nm gekennzeichnet (Abb. 7).

Darüber hinaus sind die Intensitäten der Banden von β -Faltblatt-Strukturen deutlich geringer als die der α -helikalen Banden. Folglich werden die β -Faltblatt-Signale in Spektren von Proteinen, welche beide Strukturelemente enthalten, von den α -helikalen Signalen überlagert.^[90, 91]

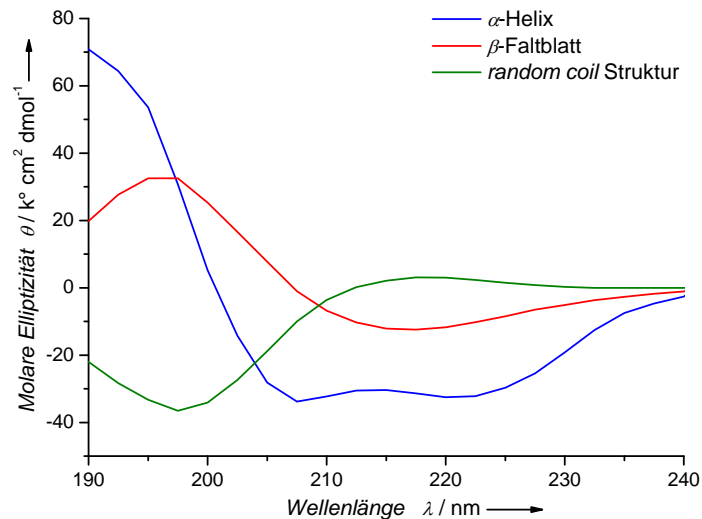


Abbildung 7. Charakteristische Fern-UV Circular dichroismus-(CD)-Spektren einer α -Helix, eines β -Faltblatts und einer ungeordneten *random coil*-Struktur.

Insgesamt ist die CD-Spektroskopie eine exzellente Methode um nützliche Hinweise für entsprechende Sekundärstrukturelemente in einem Protein bzw. Peptid zu gewinnen. Zudem lassen sich Konformationsänderungen, die beispielsweise durch Peptid-Peptid- bzw. Peptid-Ligand-Interaktionen hervorgerufen werden, sehr gut untersuchen und beschreiben.

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die strukturellen Eigenschaften von modular aufgebauten Zwei-Domänen-Proteinen am Beispiel WW-Domänen funktionalisierter Coiled Coils und einem heteromeren Komplex untersucht werden.

Im synthetischen Teil der Arbeit sollen zunächst geeignete Strategien zur Synthese der Assoziations- und Funktionsmodule entwickelt werden. Anschließend sollen die einzelnen Module chemisch synthetisiert und durch native chemische Ligation (NCL) kovalent miteinander verknüpft werden.

Im bioanalytischen Teil der Arbeit sollen die modularen Zwei-Domänen-Proteine mittels CD-, NMR- und ITC-Messungen hinsichtlich ihrer strukturellen Eigenschaften wie Faltung, Stabilität und Fähigkeit zur Assoziation sowie zur Bindung spezifischer Liganden untersucht werden.

Diese Arbeit soll folgende Fragestellungen beantworten:

1. Nehmen die Module in den jeweiligen Peptidkonstrukten eine definierte Sekundärstruktur ein ?
2. Wie wirkt sich die Zusammensetzung der einzelnen Module auf deren Faltung und Stabilität aus ?
3. Ist das funktionelle Modul im Gesamtpeptid in der Lage seinen spezifischen Liganden zu binden (Konservierung der biologischen Aktivität) ?
4. Lassen sich die unterschiedlichen modularen Peptidkonstrukte mittels Assoziation der Oligomersierungsmodule zu einem funktionellen Komplex zusammenschalten ?

3. Ergebnisse und Diskussion

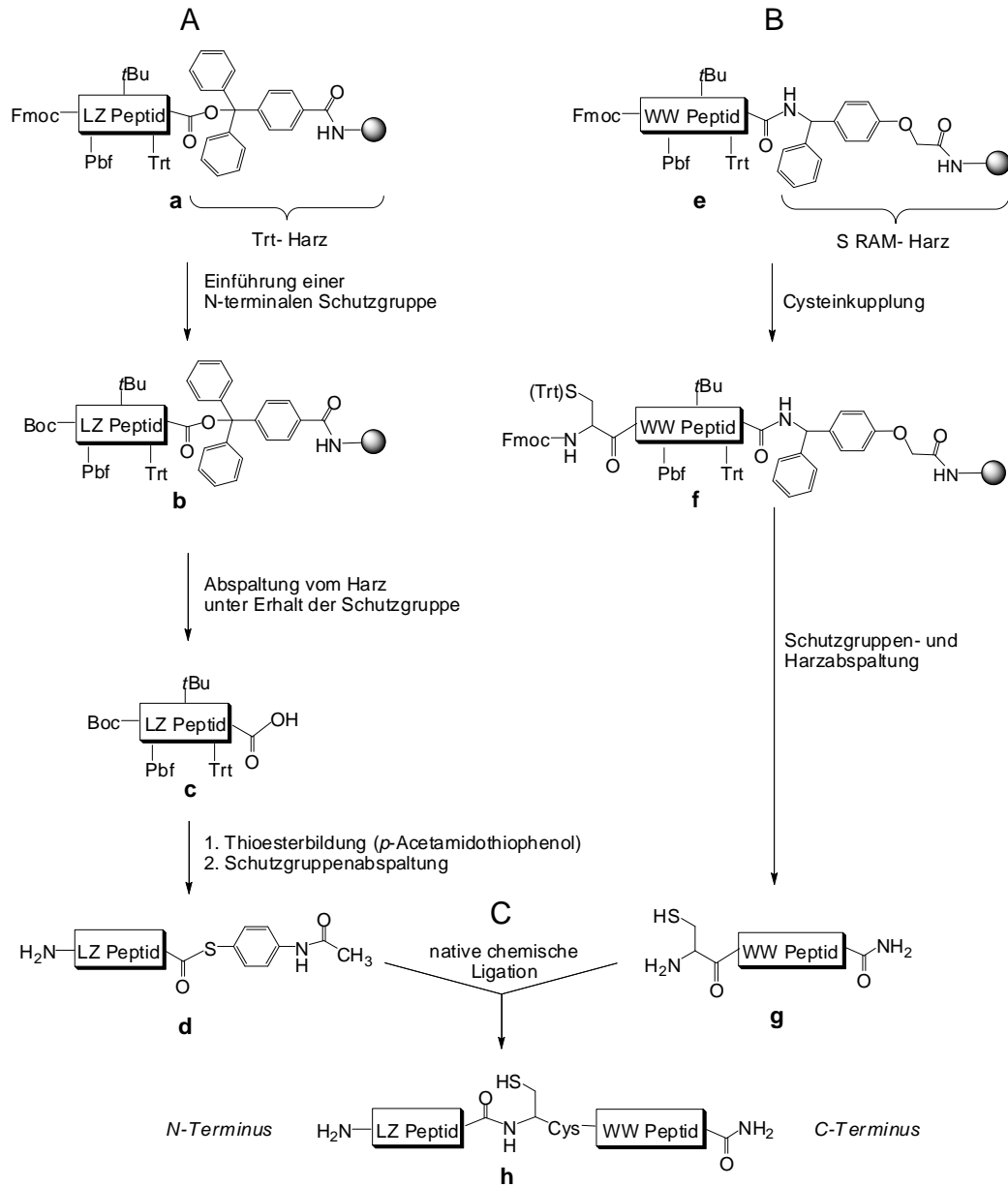
3.1. Konzept für die Synthese WW-Domänen funktionalisierter Coiled Coils

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zu Beginn ein geeignetes Synthesekonzept für die modulare Herstellung von WW-Domänen funktionalisierter Coiled Coils entwickelt werden. Hierzu sollten die einzelnen Assoziations- und Funktionalitätsmodule, also die GCN4 Leucin-Zipper-(LZ)-Varianten und die zwei WW-Domänen des TCERG1-Proteins, vorab separat synthetisiert und anschließend kovalent miteinander verknüpft werden. Die Strategie beinhaltete zunächst die Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) der LZ- und WW-Segmente nach dem Fmoc-Protokoll.^[92] Für die finale, kovalente Verknüpfung der Peptidsegmente sollte auf die native chemische Ligation (NCL) zurückgegriffen werden, um eine Ausbildung einer nativen Amidbindung zu erreichen.^[30] Um die Segmentverknüpfung beider Peptide *via* NCL gewährleisten zu können, war die Verwendung geeigneter Harze, sowie die Synthese von Peptiden mit N-terminalen Cysteinrest und C-terminalen Thioester notwendig. Letzteres bedarf zunächst der Herstellung des Carboxyl-Peptids mittels SPPS und einer weiteren Umsetzung zum α -Thioester. Es ist bekannt, dass einige WW-Domänen, wie beispielsweise die WW2-Domäne des TCERG1-Proteins, schwierig zu synthetisieren sind, da sie schon während der Synthese zu Aggregationen neigen, welche zu Löslichkeitsproblemen führen und mit einer Zunahme an Abbruchsequenzen einhergehen.^[93] Folglich wäre jede weitere Umsetzung dieser Peptide mit zusätzlichen Ausbeuteverlusten verbunden.^[94] Diesbezüglich sollten die WW-Domänen nach der Festphasensynthese nicht weiter zu C-terminalen Thioester umgesetzt werden. Einfacher wäre es, die WW-Domänen als N-terminale Cysteinyl-Peptide und die Leucin-Zipper-Peptide als C-terminale Peptidthioester zu synthetisieren, um anschließend beide Peptide mittels chemoselektiver Ligation miteinander verknüpfen zu können.

Die Darstellung der benötigten LZ-Peptidthioester setzte zunächst die SPPS mit einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie voraus, an die sich die Veresterung der C-terminalen Carboxylgruppe zu einem Thioester anschließt (Schema 4, A).

Um während der Thioesterbildung gezielt nur die C-terminale, freie Carboxylgruppe zu verestern und gleichzeitig unerwünschte Reaktionen am N-terminalen, freien Amin sowie an den Seitengruppen zu verhindern, müssen diese nach der Abspaltung des Peptids vom Harz geschützt vorliegen. Dies erfordert eine N-terminale Schutzgruppe, die einerseits während der Harzabspaltung erhalten bleibt und andererseits nach der Thioesterbildung zusammen mit den restlichen Schutzgruppen im Peptid unter denselben Bedingungen entfernt werden kann. Hierfür eignet sich besonders die *tert*-Butyloxycarbonyl-(Boc)-Schutzgruppe. Diese bleibt unter milden sauren Bedingungen (z.B. während einer Essigsäure vermittelten Abspaltung der Peptide vom Harz) erhalten, ist jedoch mit starken Säuren, wie TFA, abspaltbar (Schema 4, b). Die Wahl eines Trityl-(Trt)-Harzes ermöglicht es, die Peptide unter milden, sauren Bedingungen sowie unter Erhalt aller Seitenschutzgruppen vom Harz abzuspalten und die C-terminalen Carbonsäuren zu generieren (Schema 4, c). Es sollten Trityl-Harze gewählt werden, die bereits mit der ersten Aminosäure vorbeladen sind.^[95] Der Vorteil solcher Harze liegt in der einfachen Handhabung, da das Harz nicht aufwendig mit der ersten Aminosäure beladen werden muss. Für die Umsetzung des geschützten LZ-Peptids mit freier C-terminaler Carboxygruppe sollte ein Thiol, hier *p*-Acetamidothiophenol, verwendet und durch anschließende finale Abspaltung aller Schutzgruppen der ungeschützte LZ-Peptidthioester erzeugt werden (Schema 4, d).^[45]

Die Herstellung der WW-Peptide sollte ebenfalls unter Verwendung der Festphasen-Synthese erfolgen (Schema 4, B). Im Hinblick auf die NCL sollten die WW-Peptide mittels Fmoc-SPPS synthetisiert und nach Einführen eines N-terminalen Cysteins vollständig vom Harz abgespalten werden (Schema 4, e-f). Da für die Cysteinyll-WW-Peptide keine weiteren Umsetzungen vorgesehen waren, wurden S RAM-Harze gewählt, die es erlauben die Zielpeptide unter sauren Bedingungen abzuspalten.^[96] Abschließend sollten die ungeschützten LZ- und WW-Segmente mittels nativer chemischer Ligation unter neutralen Bedingungen kovalent miteinander verknüpft werden und zu den entsprechenden Leucin-Zipper-WW-(LZWW)-Zielpeptiden führen (Schema 4, C).



Schema 4. Synthesekonzept für WW-Domänen funktionalisierte Leucin-Zipper-(LZ)-Peptide. **A.** Fmoc-basierte SPPS der Leucin-Zipper Peptide (a-c) mit anschließender Veresterung der freien Carboxygruppe zum LZ-Thioester (d). **B.** Fmoc-basierte SPPS der N-terminalen Cysteinyl-WW-Peptide (e, f) mit anschließender Schutzgruppen- und Harzabspaltung (g). **C.** Finale Verknüpfung der LZ- und WW-Segmente zum LZWW-Ligationsprodukt (h) mittels NCL.

Die zu synthetisierenden Sequenzen der Leucin-Zipper-Varianten und der WW-Peptide des TCERG1-Proteins sind in folgender Tabelle 1 aufgeführt.

	Name	Peptidsequenzen	AS
1	LZ1	ARMKQLEDKV ¹⁰ <u>E</u> EELLSK ^{NYHL} ²⁰ ENEKARLEKL ³⁰ VA _{COR1}	32
1a	LZ1 Thio	ARMKQLEDKV ¹⁰ <u>E</u> EELLSK ^{NYHL} ²⁰ ENEKARLEKL ³⁰ VA _{COR2}	32
2	LZ3	ARMKQLEDKV ¹⁰ <u>E</u> EELLSKI ^{YHN} ²⁰ ENEVARLKKL ³⁰ VA _{COR1}	32
2a	LZ3 Thio	ARMKQLEDKV ¹⁰ <u>E</u> EELLSKI ^{YHN} ²⁰ ENEVARLKKL ³⁰ VA _{COR2}	32
3	WW2	CGGAVSEWTE ¹⁰ YKTANGK <u>T</u> YY ²⁰ YNNRTLE <u>S</u> TW ³⁰ EKPQ _{COR1}	34
4	WW3	CGGV <u>A</u> TAPIP ¹⁰ GTPWCVV <u>T</u> IG ²⁰ DERVFFYNPT ³⁰ TR <u>L</u> SMWDR _{COR1}	38

Tabelle 1. Sequenzen der GCN4 Leucin-Zipper-Varianten und der TCERG1-WW-Domänen. Die unterstrichenen Aminosäuren markieren die Positionen, wo der Einsatz von Pseudoprolinen zur Syntheseoptimierung erfolgte. AS = Aminosäure, R1 = -NH₂, R2 = -SR Thioester.

Die aufgrund ihres Assoziationsverhaltens ausgewählten Sequenzen der LZ1- und LZ3-Peptide (**1**) und (**2**) entsprechen den GCN4 Leucin-Zipper-Mutanten, welche mit Hilfe der SPOT-Synthese durch Doppelsubstitutionen an der GCN4 LZ-Wildtypsequenz von M. Portwich *et al.* erhalten wurden.^[64] Die LZ1-Variante (**1**) resultierte aus dem Austausch von Valin (wt) gegen Leucin (V→K²⁴) und Lysin (wt) gegen Glutaminsäure (K→E²⁸) während für die LZ3-Variante (**2**) Asparagin (wt) gegen Isoleucin (N→I¹⁷) und Leucin (wt) gegen Asparagin (L→N²⁰) ersetzt wurde. Die ausgewählte WW2-Sequenz (**3**) entspricht der von S. Tremmel *et al.* modifizierten Sequenz.^[97] Hier wurde zur Vermeidung einer Aspartimidbildung Asparaginsäure gegen Asparagin (N¹⁵) substituiert. Die WW3-Sequenz (**4**) entspricht dem nativen Wildtyp der dritten WW-Domäne des TCERG1-Proteins (UniProtKB/Swiss-Prot: O14776). Da für die native chemische Ligation N-terminale Cysteiny-Peptide benötigt werden, wurde jeweils ein nicht-sequentielles Cystein am N-Terminus der WW-Domänen (**3**, **4**) eingeführt (Tabelle 1). Dies wurde unter der Annahme durchgeführt, dass die Modifikation keinen Einfluss auf die strukturellen Eigenschaften der WW-Domänen hat, da der Einsatz der Cysteinreste nicht an relevanten Faltblattregionen erfolgt. Zusätzlich wurden jeweils zwei Glycinreste als Abstandhalter zwischen der N-terminalen Aminosäure und dem nicht-nativen Cysteinrest eingefügt (**3**, **4**). Ferner sollten an geeigneten Sequenzabschnitten durch die Verwendung von Oxazolidin-Dipeptiden, den sogenannten Pseudo-

3.2. Synthese der Oligomerisierungs- und Funktionsmodule

3.2.1. Synthese der GCN4 Leucin-Zipper

Die Synthesen der GCN4 Leucin-Zipper-Varianten wurden im 0.05 mmol Maßstab an einem mit Alanin vorbeladenen Trityl-Harz mittels automatisierter Festphasensynthese nach dem Fmoc-Protokoll durchgeführt.^[92] Aufgrund dessen ist in Schema 5 exemplarisch nur die Synthese von **1a** dargestellt. Ausgehend von vorbeladenen Harzen mit Alanin wurden die jeweils 32 Aminosäuren langen Peptide (**1**) und (**2**) vom C- nach N-Terminus synthetisiert (Schema 5, a). Die Leucin-Zipper-Peptide wurden schrittweise durch Fmoc-Strategie assembliert, wobei mit einem Aminosäureüberschuss von 4 Äquivalenten (bezogen auf die Harz-Grundbeladung) gearbeitet wurde. Zur Aktivierung kam PyBOP (4 Äquiv.) in Gegenwart von NMM in DMF bzw. NMP zum Einsatz. Da für die Ligationsexperimente Peptidthioester benötigt wurden, war die Synthese C-terminaler Thioester notwendig. Aus diesem Grund sollte nach Aufbau und Harzabspaltung des Peptids die Carboxylgruppe verestert werden. Um unerwünschte Nebenreaktionen an ungeschützten Seitengruppen zu unterbinden, sollte das Peptid vollständig geschützt, jedoch mit freiem C-Terminus, vorliegen. Daher musste eine N-terminale Schutzgruppe eingeführt werden, die während der Abspaltung des Peptids vom Trityl-Harz stabil gegenüber milden sauren Bedingungen ist. Folglich wurde Boc-Ala-OH (5 Äquiv.) mit HOBt (5 Äquiv.) und DIC (5 Äquiv.) in DMF an den jeweiligen N-Terminus gekuppelt (Schema 5, b). Der Einsatz des Trityl-Harzes ermöglichte die Abspaltung der LZ-Peptide (**1**) und (**2**) vom Harz mit Essigsäure und TFE in DCM (1:1:3), unter Erhalt aller Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren, sowie der N-terminalen Boc-Schutzgruppe (Schema 5, c). Anschließend wurden die geschützten Rohpeptide mit *p*-Acetamidothiophenol (15 Äquiv.) und DIC (2 Äquiv.) in wasserfreiem DCM und unter Sauerstoffausschluss über Nacht zu C-terminalen Thioestern (**1a**) und (**2a**) funktionalisiert (Schema 5, d). Nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgte die finale Abspaltung aller säurelabilen Schutzgruppen an den Seitenketten und am N-Terminus mit TFA in Gegenwart von Scavengern für 3-4 h (Schema 5, e).

Die Peptidthioester (**1a**) und (**2a**) wurden anschließend in Ether gefällt und mittels präparativer HPLC gereinigt. Die Analyse der Peptide erfolgte unter Verwendung von analytischer HPLC und MALDI-ToF-MS (Abb. 9, A-D). In Abbildung 9A bzw. 9C sind die HPLC Spektren von **1a** bzw. **2a** gezeigt. Die Analyse von **1a** mittels analytischer HPLC zeigte das gewünschte Peptid bei einer Retentionszeit $t_r = 13.9$ min. Der scharfe Peak mit der entsprechenden Masse ($m/z = 3975.2$ $[M+H]^+$) ließ auf ein einheitliches Produkt mit hoher Reinheit schließen (Abb. 9, B). Die Ausbeute von **1a** betrug 19% (38 mg, 9.6 μmol). Ebenso konnte **2a** übereinstimmend mit der erwarteten Masse ($m/z = 3945.8$ $[M+H]^+$) bei einer Retentionszeit $t_r = 14.9$ min nachgewiesen werden. Die Ausbeute von **2a** betrug von 16% (32 mg, 8.1 μmol).

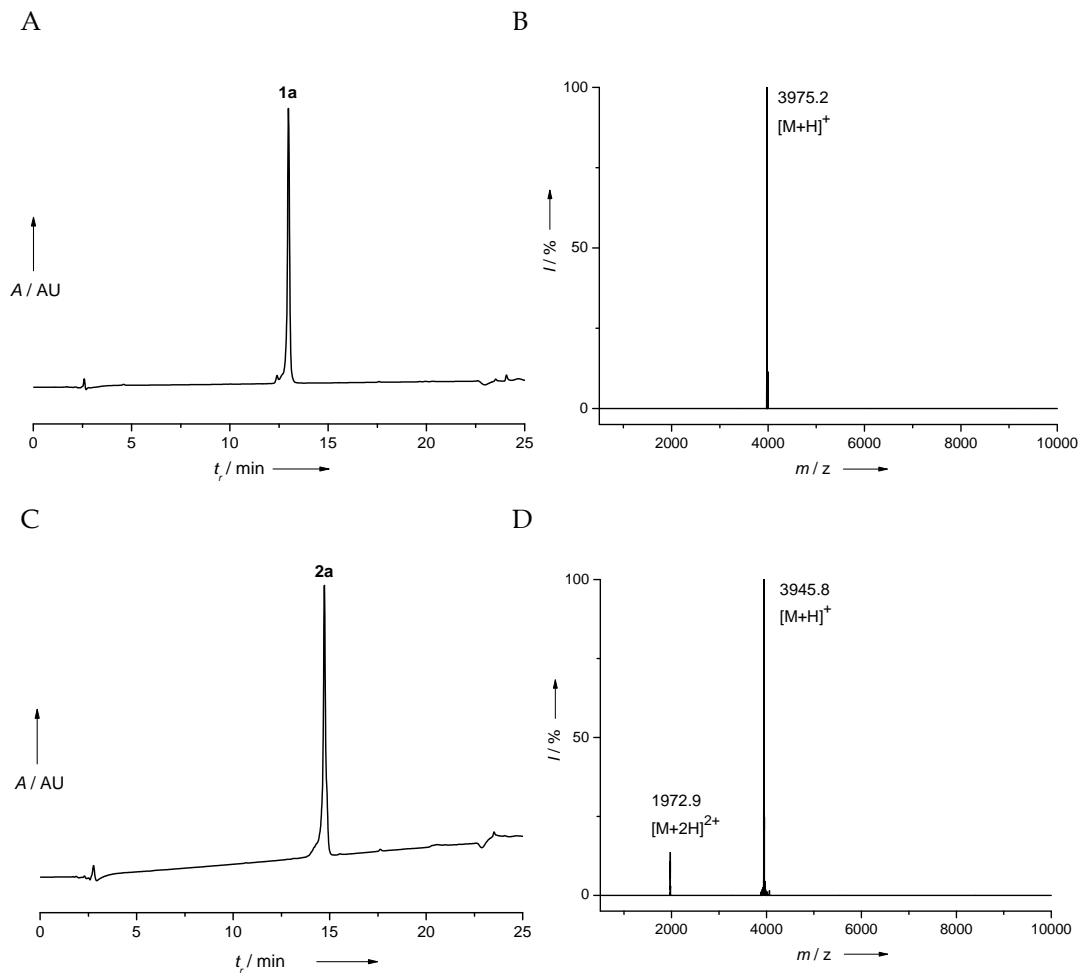


Abbildung 9. HPLC-Chromatogramm und MALDI-ToF Spektrum der Leucin-Zipper Peptidthioester (**1a**) und (**2a**). **A.** HPLC-Profil von **1a** bei einer Retentionszeit $t_r = 13.9$ min; **B.** MALDI-ToF von **1a** $m/z = 3975.2$ $[M+H]^+$; **C.** HPLC Profil von **2a** bei einer Retentionszeit $t_r = 14.9$ min; **D.** MALDI-ToF von **2a** $m/z = 3945.8$ $[M+H]^+$. Das MS von **2a** weist neben dem einfach geladenen Hauptsignal ein weiteres Signal auf, welches dem zweifach geladenen Peptid $m/z = 1972.9$ $[M+2H]^{2+}$ entspricht.

3.2.2. Synthese der WW2- und WW3-Domänen

Zur Herstellung der WW2-Domäne (3) wurden die von S. Tremmel *et al.*^[97] eingeführten Modifikationen zur Optimierung der Synthese verwendet. Hierzu zählten der Austausch von Asparaginsäure gegen Asparagin (Tabelle 1, D¹⁵→N¹⁵), um die Bildung eines Aspartimids zu verhindern sowie der Einsatz von Pseudoprolinbausteinen (KT, ES). Ebenso wurden für die Synthese des WW3-Segments (4) die Oxazolidin-Dipeptide LS, WT und AT verwendet (Tabelle 1). Im Hinblick auf die folgenden Ligationsexperimente wurden am N-Terminus beider WW-Domänen jeweils ein nicht-sequentieller Cysteinrest sowie ein kurzer Linker (bestehend aus zwei Glycinresten) eingebaut, welcher im Ligationsprodukt zwischen den Coiled Coil- und WW-Peptidsegmenten als Abstandhalter fungieren sollte.

Die Synthesen der WW2- und WW3-Peptide (3) und (4) wurden analog im 0.05 mmol Maßstab mittels automatisierter Festphasensynthese an einem S RAM-Harz durchgeführt. Die Aminosäurekupplungen erfolgten nach dem Fmoc-Protokoll mit PyBOP und NMM in DMF bzw. NMP. Während das ungeschützte Cysteiny1-WW2-Peptid (3) in guten Ausbeuten von 20% synthetisiert werden konnte, brachte die Synthese des WW3-Peptids (4) einige Probleme mit sich. Nach saurer Abspaltung vom Harz mit TFA wurde das Rohpeptid erhalten und mittels analytischer HPLC analysiert (Abb. 10).

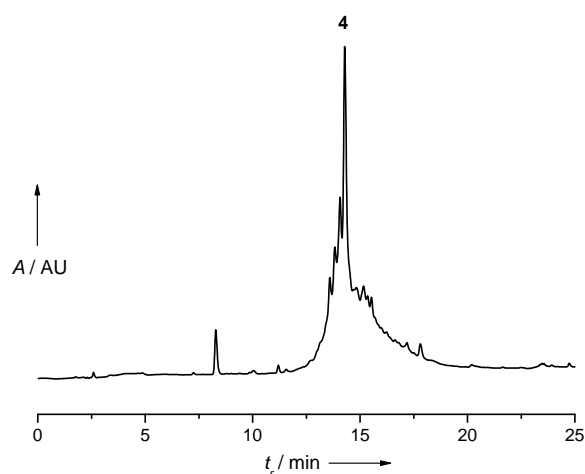


Abbildung 10. HPLC-Chromatogramm des WW3-Rohpeptids (4). Der breite Peak resultiert aus den überlagerten Peaks, welche durch Abbruchsequenzen während der Synthese verursacht werden. Die Trennleistung wurde dadurch deutlich herabgesetzt.

Das HPLC-Chromatogramm zeigt jedoch neben einem Hauptpeak weitere überlagerte Peaks, welche höchstwahrscheinlich auf unvollständige Umsetzung bzw. Abbruchsequenzen zurückzuführen sind. Aufgrund der relativ gleichen Retentionszeiten der Signale war die Reinigung des Rohprodukts erheblich erschwert und in Folge konnten nur sehr geringe Mengen des WW3-Peptids (**4**) erhalten werden. Unterschiedliche Längenanalysen des WW3-Peptids mittels SPPS haben ergeben, dass besonders der N-terminale „VATA“-Bereich die Synthese erschwerte. Aus diesem Grund wurde im Zuge einer Syntheseoptimierung an den „VATA“-Sequenzabschnitten nach jedem der beiden Alanin-Aminosäurekupplungen ein Cappingschritt mit Acetanhydrid in DMF (Ac₂O : DIEA : DMF, 2:1:7) durchgeführt, der zu einer Verbesserung der Synthese führte. Andererseits wurde die Sequenz von **4** am C-Terminus, unter der Annahme, dass die β -Faltblatt-Sekundärstruktur dadurch nicht beeinträchtigt wird, um acht Aminosäuren verkürzt (Abb. 11). Entsprechend der mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Untersuchungen aufgelösten Sekundärstruktur der TCERG1-WW3-Domäne (PDB 2DK7)^[81] wurden nur die drei β -Faltblattregionen (Cys¹ bis Thr³⁰) in die neue Peptidsequenz (**5**) mit einbezogen (vgl. Abb. 6, C).

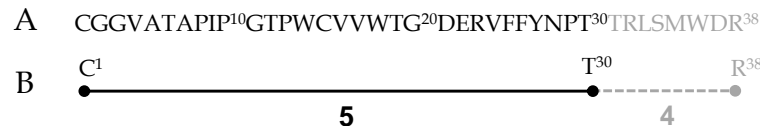
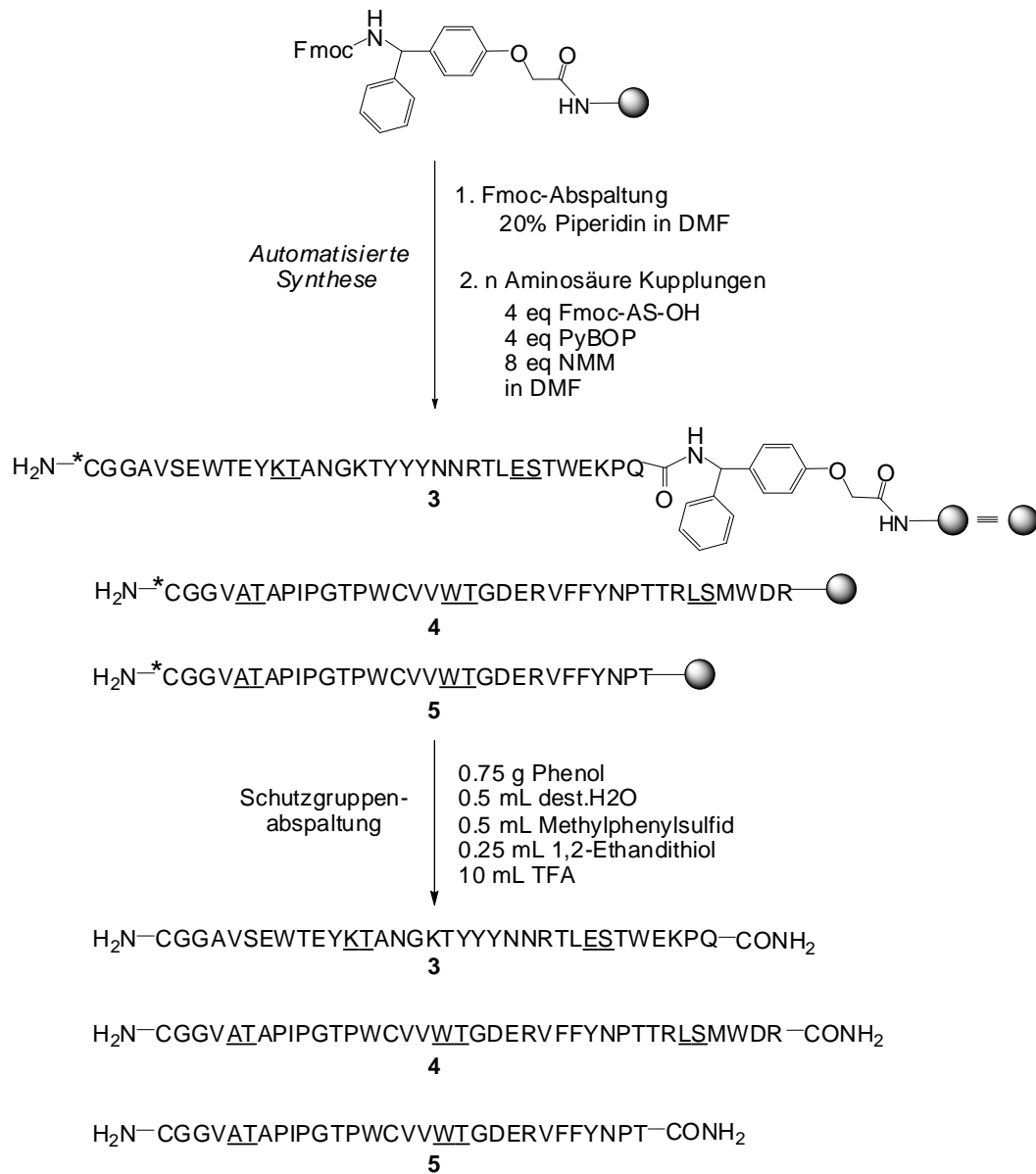


Abbildung 11. Aminosäuresequenz des WW3-Segments. **A.** WW3-Sequenz vom N- zum C-Terminus (von links nach rechts). **B.** Schematische Darstellung des WW3-Segments (**5**) (schwarze, durchgezogene Linie). Zum Vergleich ist die längere Sequenz von **4** dargestellt (grau gestrichelte Linie).

Die Festphasensynthesen der WW-Peptide (3), (4) und (5) sind in Schema 6 dargestellt. Die finale Schutzgruppen- und Harzabspaltung aller Peptide erfolgte in TFA/H₂O/Methylphenylsulfid/1,2-Ethandithiol in Gegenwart von Phenol.



Schema 6. Festphasensynthese der TCERG1-WW-Peptide (3), (4) und (5) an einem S RAM-Harz. Die mit einem Stern * gekennzeichneten Peptide haben Schutzgruppen an den jeweiligen Aminosäureseitenketten. Die Synthesen von allen WW-Domänen (3), (4) und (5) verlaufen analog.

Alle Rohpeptide wurden präparativ gereinigt und mittels analytischer HPLC und MALDI-ToF charakterisiert (Abb. 12, A-D). Die Cysteinyll-WW2-Domäne (**3**) konnte mit einer Ausbeute von 20 % (40 mg, 10.1 μmol) bestimmt und bei einer Retentionszeit $t_r = 9.8$ min übereinstimmend mit der gewünschten Masse $m/z = 3975.5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ nachgewiesen werden (Abb. 12, A, B). Die Reinheit beträgt laut HPLC 90%. Ebenso konnte das Cysteinyll-WW3-Peptid (**5**) bei einer Retentionszeit von $t_r = 14.3$ min mit der erwarteten Masse $m/z = 3241.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ identifiziert werden (Abb. 12, C, D). Die Ausbeute des Cys-WW3-Peptids (**5**) betrug 14 % (22 mg, 6.8 μmol) und die Reinheit nach einmaliger präparativer HPLC Reinigung ca. 75 %, was sich in der typischen Verbreiterung des Peaks widerspiegelt.

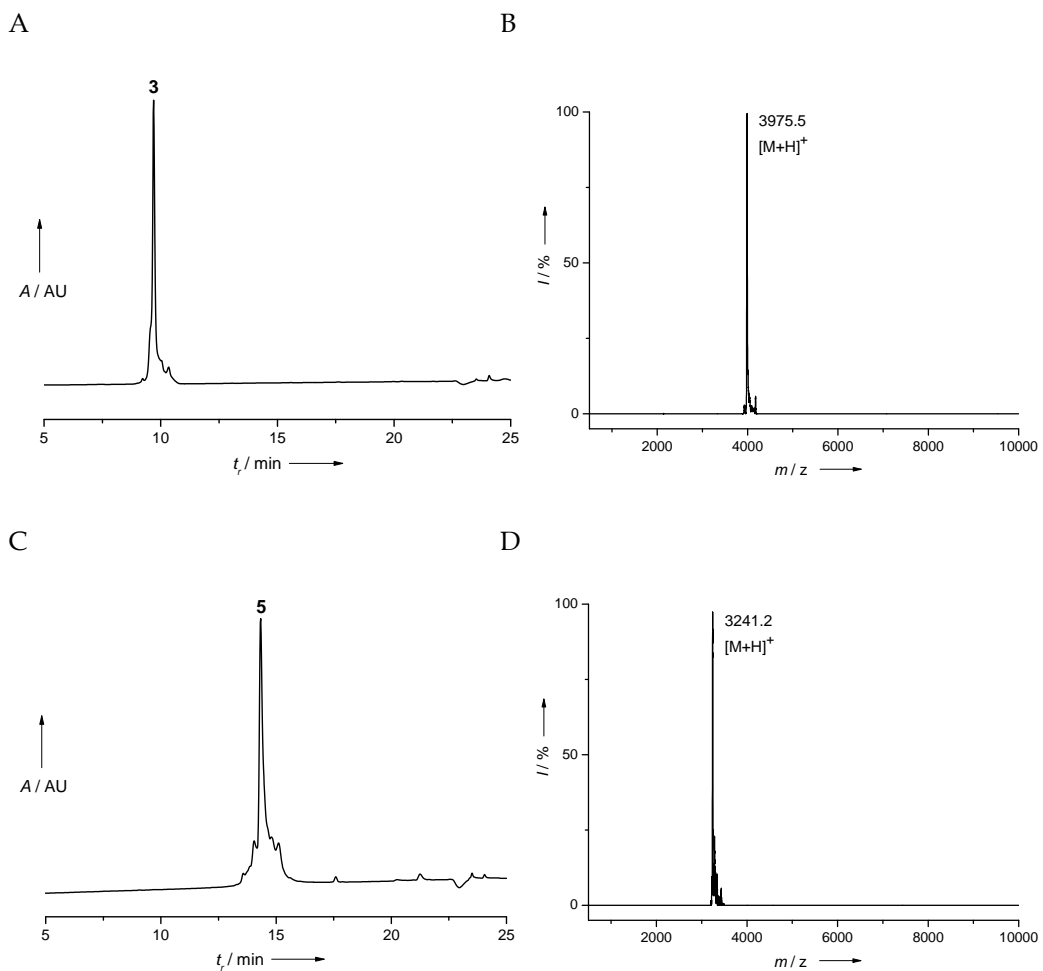


Abbildung 12. HPLC-Chromatogramm und MALDI-ToF Spektrum der Cysteinyll-WW-Peptide (**3**) und (**5**). **A.** HPLC-Profil von **3** bei einer Retentionszeit $t_r = 9.8$ min; **B.** MALDI-ToF von **3** $m/z = 3975.5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($M_{\text{berechnet}} = 3975.3$ g/mol); **C.** HPLC Profil von **5** bei einer Retentionszeit $t_r = 14.3$ min; **D.** MALDI-ToF von **5** $m/z = 3241.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($M_{\text{berechnet}} = 3240.7$ g/mol).

Im Vergleich zu den HPLC-Profilen der WW-Domänen ist zu erkennen, dass die Reinheit (laut HPLC) der Leucin-Zipper höher ist, was auf die effizienten Synthesen der Leucin-Zipper Peptide zurückzuführen ist.

In Tabelle 2 sind die LZ- und WW-Peptide zusammengefasst, die für die folgenden Ligationsexperimente relevant sind.

Name	Peptidsequenzen	M [g/mol]	[M+H] ⁺	Peptid-reinheit*	Ausbeute
1a	LZ1 Thio ARMKQLEDKV ¹⁰ EELLSKNYHL ²⁰ ENEKARLEKL ³⁰ VA _{COR2}	3975.6	3975.2	>95 %	19 %
2a	LZ3 Thio ARMKQLEDKV ¹⁰ EELLSKIYHN ²⁰ ENEVARLKKL ³⁰ VA _{COR2}	3945.6	3945.8	>93 %	16 %
3	WW2 CCGAVSEWTE ¹⁰ YKTANGK ²⁰ TY ²⁰ YNNRTLESTW ³⁰ EKPQ _{COR1}	3975.3	3975.5	90 %	20 %
5	WW3 kurz CCGVATAPI ¹⁰ GTPWCVV ²⁰ WTG ²⁰ DERVFFYNPT ³⁰ _{COR1}	3240.7	3241.2	75 %	14 %

Tabelle 2. Peptidsequenzen und Massen der synthetisierten LZ-Thioesterpeptide und der TCERG1-WW-Domänen. M [g/mol] = berechnete Masse, R1 = NH₂, R2 = *p*-Acetamidothiophenol (*p*-Aatp). * Peptidreinheit laut analytischer HPLC.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass sowohl die Leucin-Zipper Peptidthioester (**1a**) und (**2a**), als auch die Cysteinyl-WW-Peptide (**3**) und (**5**) erfolgreich synthetisiert werden konnten. Dabei konnten im Falle der LZ-Peptide die freien Carboxylgruppen mit Hilfe einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie erfolgreich in die entsprechenden Thioester überführt werden. Zudem wurden die Synthesen der WW-Peptide durch den Einsatz von Oxazolidin-Dipeptiden verbessert, woraufhin die WW2-Domäne (**3**) in sehr guter Reinheit und Ausbeute erhalten wurde. Umgekehrt gestaltete sich die Synthese der WW3-Domäne (**4**) trotz Einsatz von Pseudoprolinen weitaus schwieriger und führte zu niedrigen Ausbeuten. Im Zuge einer Syntheseoptimierung wurde die Sequenz von **4** C-terminal verkürzt und an den N-terminalen "VATA"-Sequenzabschnitten Acetylierungen nach beiden Alanin Aminosäurekupplungen vorgenommen. Dadurch konnte die Synthese verbessert und **5** im Vergleich zu **4** in höheren Ausbeuten und Reinheit erzielt werden.

3.3. Kovalente Verknüpfung der Oligomerisierungs- und Funktionsmodule: Synthese der LZWW-Peptide durch native chemische Ligation (NCL)

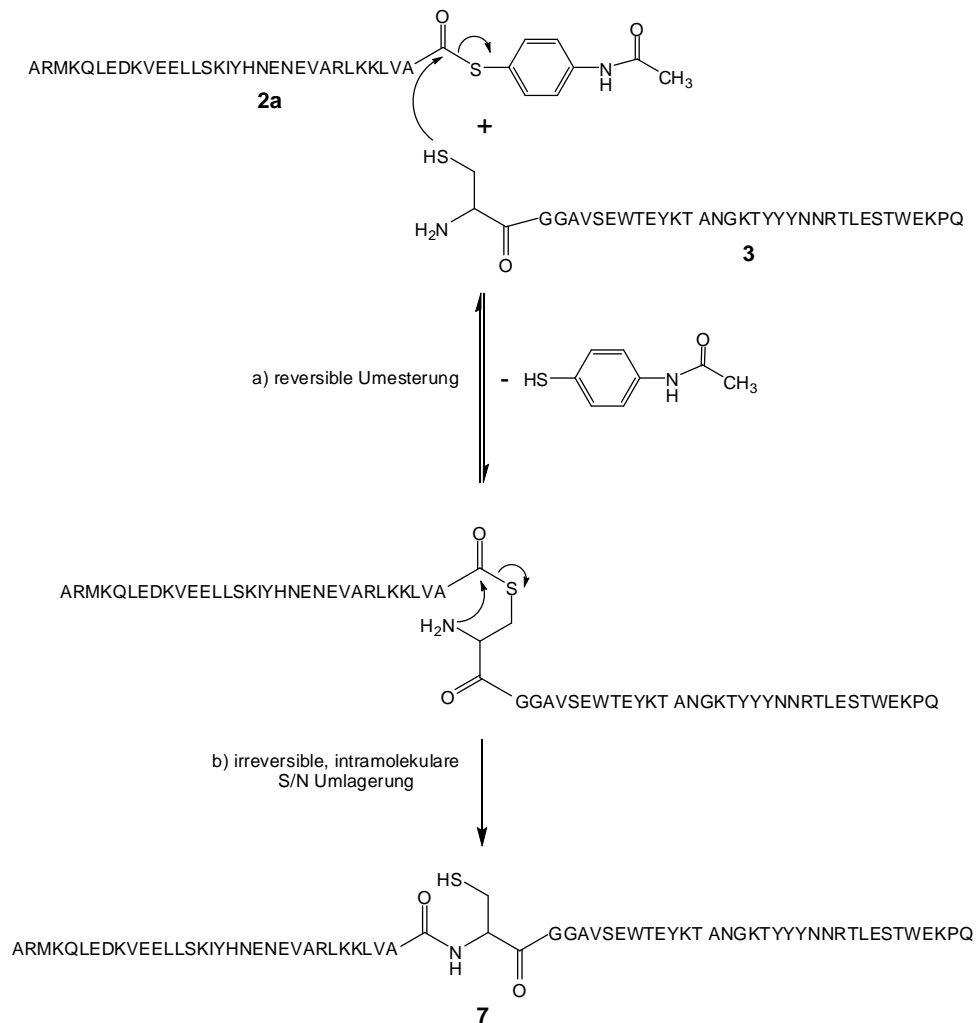
Trotz der Fortschritte bei der Verwendung der Festphasen-Peptidsynthese stellt die Synthese von längeren Peptiden (>40 AS) nach wie vor eine große Herausforderung dar. Der Grund liegt vor allem darin, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Fehlsequenzen durch unvollständige Aminosäurekupplungen mit zunehmender Peptidlänge zunimmt. Infolgedessen werden die Reinheit und Ausbeuten der Rohprodukte erheblich gesenkt. Um dem entgegen zu wirken untergliedert man Peptide mit einer Länge von mehr als 40 bis 50 Aminosäuren vorzugsweise in mehrere Peptidsegmente, wobei vorher geeignete Schnittstellen festgelegt werden müssen. Nach schrittweiser Synthese der jeweiligen Peptidsegmente erfolgt deren Verknüpfung (Kondensation) zum gewünschten Zielpeptid.^[100, 101] Die als native chemische Ligation (NCL) bezeichnete selektive Verknüpfung ungeschützter Peptidsegmente in wässrigen Lösungen hat sich hierfür als Methode der Wahl erwiesen und eröffnet den Zugang zu größeren Proteinen in hohen Ausbeuten.^[33] Voraussetzung für diese effiziente Methode ist das Vorhandensein eines Thioesters an der Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure des einen Peptids (N-terminales Peptid) und ein Cysteinrest am N-Terminus des anderen Peptids (C-terminales Peptid). In dieser Arbeit wurde die modulare Synthese von kleinen LZWW-Proteinen durch native chemische Ligation unter Verwendung der in Tabelle 3 aufgelisteten Peptidsegmente durchgeführt.

Ligation	Thioester Peptid	+	Cystein Peptid	Ligationsprodukt
I (1a+5)	1a H ₂ N-LZ1-COR2		5 H ₂ N-WW3-COR1	6 H ₂ N-LZ1-WW3-COR1
II (2a+3)	2a H ₂ N-LZ3-COR2		3 H ₂ N-WW2-COR1	7 H ₂ N-LZ3-WW2-COR1

Tabelle 3. Native chemische Ligation. Die Synthese von LZ1WW3 (**6**) umfasst die Ligation zwischen **1a** und **5**. Die Synthese von LZ3WW2 (**7**) umfasst die Ligation von **2a** mit **3**. R1 = -NH₂, R2 = *p*-Acetamidothiophenol.

Die Verknüpfung der zuvor synthetisierten und entschützten LZ- und WW-Peptidsegmente erfolgte mittels NCL eines N-terminalen Cysteinyl-WW- und eines C-terminalen LZ-Segments. Die NCL wurde für alle synthetisierten LZWW-Peptide unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

An dieser Stelle wird beispielhaft nur der Mechanismus für die NCL zwischen dem LZ3-Peptidthioester (**2a**) und dem Cysteinyl-WW2-Peptid (**3**) dargestellt (Schema 7). Zu Beginn der NCL greift die Sulfhydrylgruppe (Thiolgruppe) des Cysteinyl-WW-Peptids (**3**) den LZ-Thioester (**2a**) an, woraufhin eine reversible Umesterung am LZ-Peptidthioester (**2a**) stattfindet (Schema 7, a). Als Folge ihrer günstigen Anordnung zueinander findet ein intramolekularer Angriff der α -Aminogruppe des Cysteinyl-Peptids (**3**) auf das Carbonyl-Kohlenstoff des neuen Peptidthioesters statt, wodurch es zur irreversiblen Ausbildung einer Amidbindung kommt (Schema 7, b). Im Zuge dieser finalen *S/N*-Acyl-Umlagerung wird die Reaktion in Richtung der thermodynamisch stabileren Peptidbindung forciert und es entsteht das Ligationsprodukt (**7**).



Schema 7. Mechanismus der nativen chemischen Ligation für LZ3WW2. Dargestellt ist die NCL zwischen dem LZ3-Peptidthioester (**2a**) und dem WW2-Peptid (**3**) zum LZ3WW2-Ligationspeptid (**7**). Der Mechanismus für die NCL zwischen **1a** und **5** verläuft analog.

3.3.1. Synthese des LZ3WW2-Ligationspeptids

Die Durchführung der Ligation zwischen dem LZ3-Peptidthioester (**2a**) und der Cys-WW2-Domäne (**3**) erfolgte in einer Konzentration von 1.25 mM in wässrigem Ligationspuffer mit geringem Überschuss (1.1 Äquiv.) an C-terminalem Segment (**3**). Dafür wurden 6 M Guanidin Hydrochlorid (GdnHCl), 0.2 M Na₂HPO₄ und 0.02 M Tris-(2-carboxyethyl)-phosphine (TCEP) in Wasser gelöst, der pH-Wert zwischen 6.8-7.0 eingestellt und anschließend mit N₂-Gas gespült. Das Guanidin Hydrochlorid fungiert dabei als chaotropes Denaturierungsreagenz, welches die hydrophoben Wechselwirkungen aufbricht und somit zur Denaturierung (Entfaltung) der Peptidkette führt. Des Weiteren wurde TCEP zur Reduktion von Disulfidbrücken verwendet. Beide Reagenzien sollten die Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen während der Ligrationsreaktion gewährleisten. Die Ligation wurde mit dem Lösen der Peptide im Puffer, ohne Zusatz von zusätzlichen Thioladditiven gestartet und der Reaktionsverlauf mittels analytischer HPLC verfolgt. Abbildung 13 zeigt zusammengefasst die HPLC-Analysen für den Verlauf der Ligation zwischen **2a** und **3** zu **7**. Im Chromatogramm sind bei einer Reaktionszeit von $t = 15$ min die Peaks für den LZ3-Thioester (**2a**) und für das Cys-Peptid (**3**) zu sehen. Zusätzlich wurde ein neuer Peak zwischen den beiden Edukt-Signalen detektiert, der vermutlich auf das LZ3WW2-Ligationsprodukt (**7**) zurückzuführen ist. Bereits nach 1 h Reaktionszeit konnte ein kontinuierlicher Anstieg des Signals bei einer Retentionszeit von $t_r = 13.9$ min beobachtet werden. Nach 2 h entstand das Ligrationsprodukt, das eine ähnliche Retentionszeit wie das N-terminale LZ3-Peptid (**2a**) aufweist (Abb. 13). Da das Edukt-Signal von **2a** eine fast vollständige Abnahme zeigte, wurde die Reaktion nach zwei Stunden durch Einstellung eines sauren pH-Wertes (Verringerung der Nukleophilie des C-terminalen Cysteins) abgebrochen. Darüber hinaus wurde ein weiterer Peak bei einer Retentionszeit von $t_r = 10.5$ min detektiert, welcher auf *p*-Acetamidothiophenol zurückzuführen ist. Schließlich konnte das Ligrationsprodukt (**7**) bei einer Retentionszeit von $t_r = 13.9$ min charakterisiert und durch Massenspektrometrie eindeutig identifiziert werden (Abb. 14).

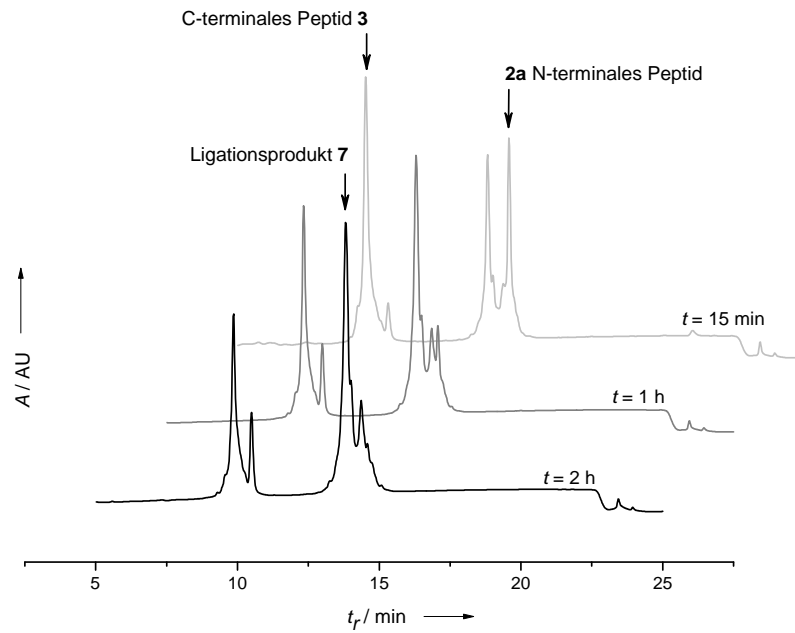


Abbildung 13. Reaktionsverlauf der NCL zwischen dem N-terminalen LZ3-Peptidthioester (**2a**) und dem C-terminalen Cys-WW2-Peptid (**3**). Der Reaktionsverlauf wurde mittels analytischer HPLC bei $t = 15$ min, 1 h und 2 h verfolgt.

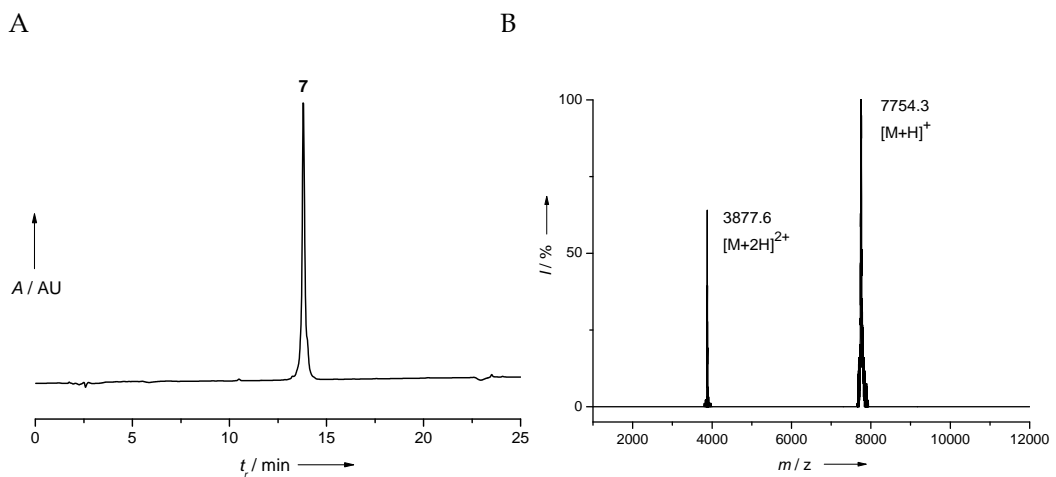


Abbildung 14. HPLC-Chromatogramm und MALDI-ToF Spektrum des LZ3WW2-Ligationsproduktes (**7**). **A.** HPLC-Profil von **7** bei einer Retentionszeit $t_r = 13.9$ min; **B.** MALDI-ToF von **7** $m/z = 7754.3$ $[M+H]^+$; Das MS von **7** weist neben dem einfach geladenen Hauptsignal ein weiteres Signal auf, welches dem zweifach geladenen Peptid $m/z = 3877.6$ $[M+2H]^{2+}$ entspricht.

Die präparative Aufreinigung erfolgte über eine C18-Säule. Anschließend wurde das Zielpeptid (**7**) isoliert und aus Acetonitril/Wasser lyophilisiert. Abbildung 14 A zeigt das aufgereinigte HPLC-Chromatogramm des LZ3WW2-Ligationsproduktes (**7**). Aus dem HPLC-Chromatogramm konnte durch Peakflächenintegration eine Reinheit von 98% ermittelt werden. Während im MALDI-ToF Spektrum der Hauptpeak von $m/z = 7754.3$ $[M+H]^+$ mit den berechneten Masse von 7753.6 g/mol übereinstimmt, entspricht der zweite Peak $m/z = 3877.6$ $[M+2H]^{2+}$ dem 2-fach geladenen Ligationspeptid (Abb. 14, B). Die erhaltene Menge an Ligationsprodukt (**7**) betrug 26 mg (3.4 μ mol), was bezogen auf die eingesetzte Menge von 40 mg (10.1 μ mol) LZ3-Peptidthioester (**2a**) und 44 mg (11.1 μ mol) Cys-WW2 (**3**) einer Ausbeute von 34% entspricht.

3.3.2. Synthese des LZ1WW3-Ligationspeptids

Die native chemische Ligation zwischen dem LZ1-Peptidthioester (**1a**) und der Cys-WW3-Domäne (**5**) erfolgte ebenfalls in einer Konzentration von 1.25 mM. Beide Peptide wurden in der Pufferlösung aufgenommen und auf einen pH-Wert zwischen 6.8-7 gebracht. Anschließend wurde der Reaktionsverlauf mit Hilfe der analytischen HPLC verfolgt. Der Ligationsverlauf zwischen **1a** und **5** ist in Abbildung 15 zusammengefasst. Zu Beginn der Reaktion (bei $t = 15$ min) sind die zwei Peaks der Edukte zu sehen, wobei der Peak für das N-terminale Peptid (**1a**) nach 2 h Reaktionszeit eine nahezu vollständige Abnahme der Peakhöhe zeigt, welche auf eine rasche Umsetzung des LZ1-Peptidthioesters (**1a**) mit dem C-terminalen Cys-Peptid (**5**) zurückzuführen ist. Allerdings konnte trotz offensichtlicher Umsetzung der Edukte kein eindeutiger Produktpeak im HPLC-Chromatogramm zugeordnet werden, was auf nahezu identische Retentionszeiten und folglich auf eine Überlagerung des LZ1WW3-Produktpeaks (**6**) mit dem des Cysteinyl-WW3-Peptids (**5**) zurückzuführen ist (Abb. 15).

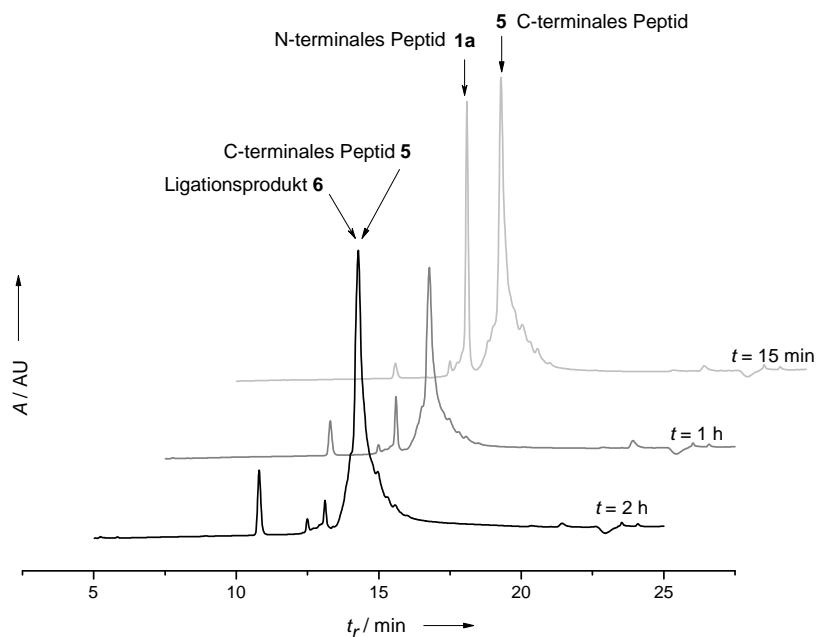


Abbildung 15. Reaktionsverlauf der NCL zwischen dem N-terminalen LZ1-Peptid (**1a**) und dem C-terminalen WW3-Peptid (**5**). Der Reaktionsverlauf wurde mittels analytischer HPLC bei $t = 15$ min, 1 h und 2 h verfolgt. Der Peak des Ligationspeptids (**6**) überlagert sich mit dem Eduktpeak des Cysteinyl-WW3-Peptids (**5**) bei einer Retentionszeit von 14.3 min.

Mögliche Gründe, weshalb die Peptide zusammen eluieren und somit gleiche Retentionszeiten aufweisen, können neben materiellen Gegebenheiten der Säulen (z.B. Säulenlänge, Säulenmaterial) und physikalischen Konstellationen (z.B. Strömungsgeschwindigkeit, LM-Effekte) auch in ihrer Strukturähnlichkeit (z.B. Isomere, ähnlicher aromatischer Charakter) liegen. In diesem Fall liegt der Grund für die Überlagerung in der Ähnlichkeit der Peptide bezüglich ihrer Polarität, weshalb sich die Trennung als sehr schwierig erwies. Versuche mit flachen Gradienten und längeren Laufzeiten (10-60% MeCN, 60 min) lieferten nicht die gewünschte Trennleistung. Abbildung 16 zeigt das HPLC-Chromatogramm der zusammen eluierenden WW3- und LZ1WW3-Peptide bei einer Retentionszeit $t_r = 14.3$ min. Der Peak bei $t_r = 13.1$ min entspricht dem LZ1-Thioester Edukt (**1a**) während der Peak bei $t_r = 10.8$ min *p*-Acetamidothiophenol zuzuordnen ist.

Auf der rechten Seite ist ein Einschub, welcher einen Abschnitt des HPLC-Chromatogramms im Falle des flachen Gradienten (10-60% MeCN, 60 min) zeigt, wobei die Trennleistung nicht zufriedenstellend war. Im Falle einer Reinigung der Peptide im präparativen Maßstab müsste mit großen Ausbeuteverlusten gerechnet werden.

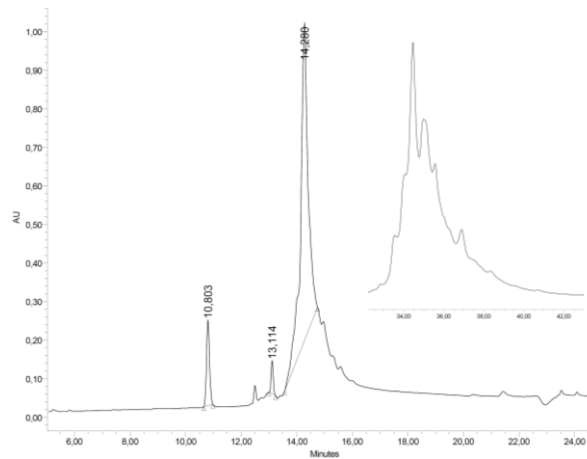


Abbildung 16. HPLC-Chromatogramme der NCL-Reaktionslösung von LZ1 mit WW3. Die Signale der Edukte und Produkte sind überlagert ($t_r = 14.3$ min). Die Trennleistung ist auch nach Änderung des Gradienten (10-60% MeCN über 60 min) sehr gering (siehe Chromatogramm recht oben).

Schließlich sollte das Trennproblem vorzugsweise durch eine alternative Syntheseroute umgangen werden. Durch Änderung der Verknüpfungsstelle für die NCL sollten neue Peptidsegmente synthetisiert werden, die bestenfalls bei unterschiedlichen Retentionszeiten eluieren und folglich die Trennung des Ligationsproduktes von den Edukten ermöglichen würden.

3.4. Alternative Strategie für die Synthese des LZ1WW3-Peptids

Mit dem Einsatz eines nicht-sequentiellen Cysteins kann die NCL theoretisch an jeder wünschenswerten Stelle durchgeführt und somit unterschiedliche Peptidsegmente synthetisiert werden. Jedoch ist in der Sequenz des LZ1WW3-Peptids (6) ein nativer Cysteinrest enthalten, welcher als eine geeignete retrosynthetische Ligationsschnittstelle für die NCL zur Verfügung steht (Abb.17 A, graue Markierung). Somit eröffnet sich für die Darstellung des LZ1WW3-Peptids eine alternative Möglichkeit zur Synthese unterschiedlicher Thioester- und Cysteinyl-Peptidsegmente. Die Schnittstelle für die Ligation wurde Richtung C-Terminus "verschoben" und somit das ursprüngliche Leucin-Zipper-Segment bis einschließlich Tryptophan (W⁴⁴) verlängert werden (Abb. 17, D). Des Weiteren wurde das WW3-Segment am C-Terminus um acht Aminosäurereste verlängert, die vorher aufgrund einer Syntheseoptimierung des WW3-Segments (4) weggelassen wurden. Schließlich sollte das neue LZ-Segment (1b) ausgehend von Tryptophan (W⁴⁴) und das neue WW3-Segment (4b) von Arginin (R⁶⁸) synthetisiert werden.

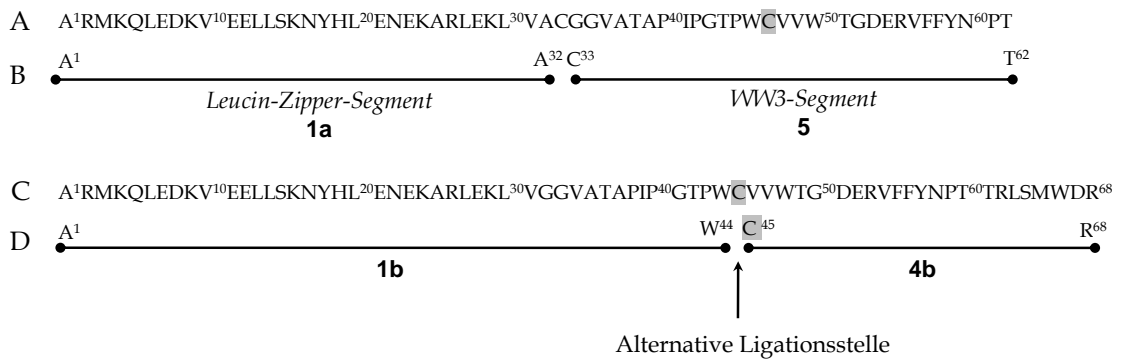


Abbildung 17: Alternative Strategie für die Synthese des LZ1WW3-Peptids. **A.** LZ1WW3 Sequenz (6) (1-62). NCL wurde zwischen dem LZ1-Segment (1a) und dem WW3-Segment (5) durchgeführt. **B.** Schematische Darstellung der Ligationsschnittstelle zwischen Alanin (A³²) und Cystein (C³³). **C.** Sequenz für die Alternativsynthese des LZ1WW3-Peptids (6b). NCL sollte zwischen 1b und 4b durchgeführt werden. **D.** Schematische Darstellung der neuen Ligationsschnittstelle zwischen Tryptophan (W⁴⁴) und dem nativen Cystein (C⁴⁵). Die Sequenzen sind vom N- zum C-Terminus dargestellt (von links nach rechts).

Dieses Konzept bietet zwei wesentliche Vorteile. Zum einen wird das bereits vorhandene Cystein als Schnittstelle für die NCL zwischen Tryptophan (W⁴⁴) und dem nativen Cystein (C⁴⁵) genutzt und somit entfällt die Einbringung eines nicht-nativen Cysteinrestes in die native Sequenz. Zum anderen sollten, verglichen mit den vorherigen Peptidsegmenten (**1a** und **5**), zwei Segmente mit unterschiedlichen Längen und Retentionszeiten resultieren, die sich idealerweise von der Retentionszeit des Produktes unterscheiden. Die zwei Glycinreste sollten als Abstandhalter zwischen LZ und WW-Peptid beibehalten werden. Einen möglichen Nachteil stellt die Synthese des 44-meren LZ-Segments dar, da es während der SPPS bei langen Sequenzen zur Bildung von Nebenprodukten bzw. Abbruchsequenzen kommen könnte, welche die Aufreinigung erschweren und die Ausbeute herabsetzen. Des Weiteren würde ein Tryptophanrest, der am C-Terminus des Thioesters lokalisiert ist, aufgrund der relativ großen Indol-Seitenkette eventuell die Reaktionsgeschwindigkeit der Umesterung während der Ligationsreaktion verringern.

3.4.1. Synthese des LZ1-Peptidthioester Segments

Die Fmoc-basierte Synthese des N-terminalen LZ1-Segments (**1b**) wurde analog der Festphasensynthese der LZ-Peptidthioester (**1a**) und (**2a**) im 0.05 mmol Maßstab an einem automatischen Peptidsynthesizer durchgeführt, wobei diesmal ein mit Tryptophan vorbeladenes Trityl-Harz verwendet wurde. Die Aminosäurekupplungen erfolgten von W⁴⁴ bis A¹ (Abb. 17, C) und die Peptidabspaltung vom Harz wurde (wie für **1a** und **2a** beschrieben) mit Essigsäure unter Erhalt der Seitenschutzgruppen erreicht. Im Anschluss wurde das geschützte Rohpeptid (**1b**) mit *p*-Acetamidothiophenol (15 Äquiv.) und DIC (2 Äquiv.) in wasserfreiem DCM versetzt und am C-Terminus zum α -Thioester umgesetzt. Im nächsten Schritt wurde das Lösungsmittel eingengt und abschließend die verbliebenden Schutzgruppen mit TFA abgespalten. Schließlich konnte das LZ1-Segment (**1b**) nach präparativer Reinigung mittels HPLC bei einer Retentionszeit von $t_r = 14.1$ min und übereinstimmend mit der erwarteten Masse $m/z = 5109.6$ mit einer Reinheit von 99% nachgewiesen werden (Abb. 18, A und B). Bezogen auf den Synthesemaßstab beträgt die Ausbeute 15% (39 mg, 7.6 μ mol).

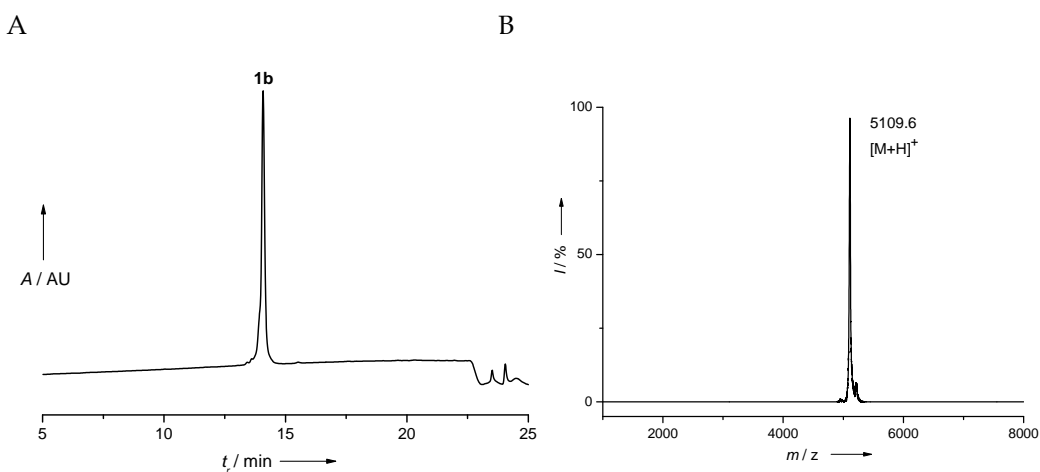


Abbildung 18. HPLC-Chromatogramm und MALDI-ToF Spektrum des LZ1-Peptidthioesters (**1b**). **A.** HPLC-Profil bei einer Retentionszeit $t_r = 14.1$ min; **B.** MALDI-ToF $m/z = 5109.6$ $[M+H]^+$.

3.4.2. Synthese des Cysteinyll-WW3-Segments

Die Synthese des C-terminalen Cysteinyll-Segments erfolgte analog der Synthese der Cysteinyll-Peptide (**3**) und (**5**) an einem S RAM-Harz im 0.05 mmol Maßstab mittels automatisierter Festphasensynthese nach dem Fmoc-Protokoll. Zur Erhöhung der Syntheseeffizienz von **4b** wurden erneut Pseudoprolin-Bausteine (WT und LS) eingeführt. Die Kettenverlängerung erfolgte vom C- nach N-Terminus ausgehend von Arginin (R⁶⁸) bis zum nativen Cystein (C⁴⁵) (vgl. Abb. 17, D). Die Kupplungen wurden mit PyBOP und NMM in DMF bzw. NMP realisiert. Anschließende Abspaltung mit einer TFA-Abspatlösung lieferte das ungeschützte Cysteinyll-Rohpeptid (**4b**). In Abbildung 19 ist das HPLC Profil des aufgereinigten Peptidsegments (**4b**) bei einer Retentionszeit von $t_r = 12.9$ min und das entsprechende Massenspektrum dargestellt. Im Gegensatz zur ursprünglichen Synthese von **4**, die durch viele Abbruchsequenzen charakterisiert war, konnte **4b** auf diesem Wege mit einer Reinheit von 93 % (bezogen auf die HPLC) isoliert werden. Die erhaltene Menge an reinem **4b** betrug 23 mg (7.7 μ mol), was einer Ausbeute von 15% entspricht. Der Grund für die effiziente Synthese liegt sowohl in der verkürzten Sequenz (24 statt 37 Aminosäurekupplungen), als auch in der Vermeidung der „VATA“- Sequenz, was offensichtlich zu einer Verbesserung der Synthese führte.

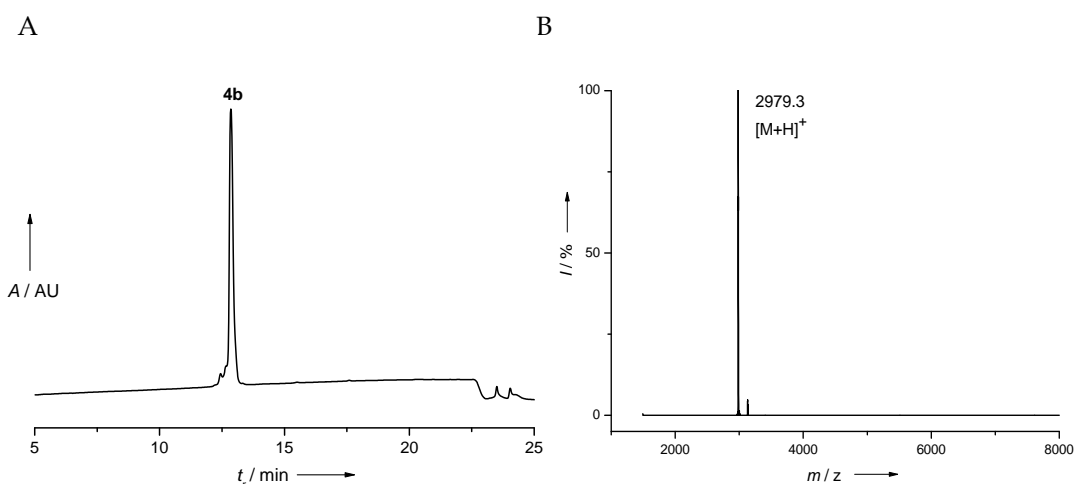


Abbildung 19. HPLC-Chromatogramm und MALDI-ToF Spektrum des Cysteinyll-WW3-Segments (**4b**). **A.** HPLC-Profil bei einer Retentionszeit $t_r = 12.9$ min; **B.** MALDI-ToF $m/z = 2979.3$ $[M+H]^+$.

3.4.3. Synthese des LZ1WW3-Ligationspeptids

Die erfolgreiche Synthese der N-terminalen und C-terminalen Peptidsegmente (**1b**) und (**4b**) eröffnete somit eine alternative Möglichkeit zur Herstellung des LZ1WW3-Zielpeptids (**6b**) mittels NCL. Hierbei sollten beide Peptidsegmente über eine neue Verknüpfungsstelle zum gewünschten LZ1WW3-Peptid führen. Die native chemische Ligation zwischen dem Peptidthioester (**1b**) und des Cys-Segments (**4b**) erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die vorherigen Ligationsexperimente für **6** und **7**. Beide Peptidsegmente (**1b**) und (**4b**) wurden in einer Konzentration von 1.25 mM im wässrigen Ligationspuffer bei einem pH-Wert zwischen 6.8-7 gelöst und die Reaktion ohne weitere Zusätze gestartet. Das C-terminale Segment (**4b**) wurde in einem geringen Überschuss (1.1 Äquiv.) eingesetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei RT gerührt und der Reaktionsverlauf mittels analytischer HPLC verfolgt (Abb. 20).

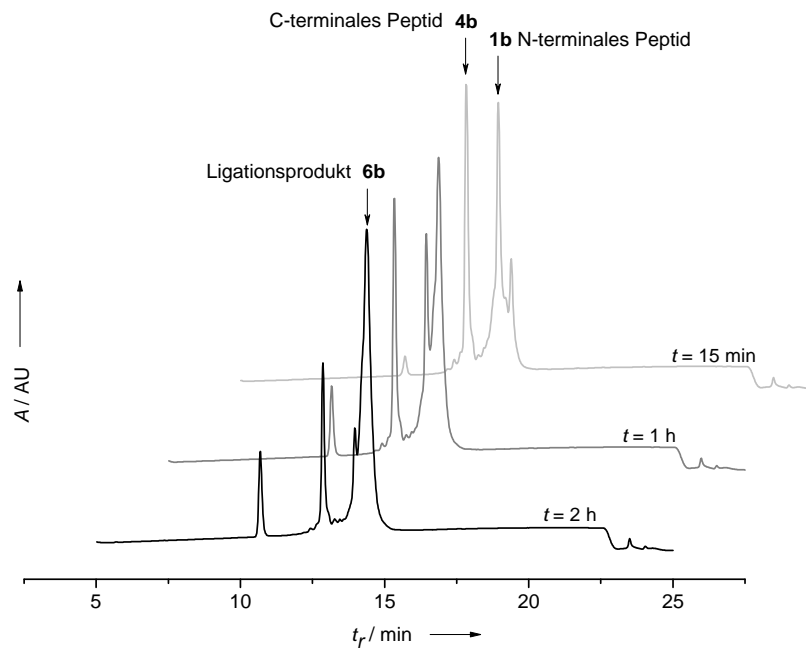


Abbildung 20. Reaktionsverlauf der NCL zwischen dem N-terminalen Peptid (**1b**) und dem C-terminalen Peptid (**4b**). Der Reaktionsverlauf wurde mittels analytischer HPLC bei $t = 15$ min, 1 h und 2 h verfolgt. Das LZ1WW3-Ligationsprodukt (**6b**) hat eine Retentionszeit von $t_r = 14.4$ min.

Im Vergleich zum vorherigen Ligationsverlauf (S.37, Abb. 15) zeigt das HPLC-Chromatogramm diesmal klar separierte Signale. In der Kurvenschar in Abbildung 20 ist die Zunahme des Peaks bei $t_r = 14.4$ min zu erkennen, der dem gewünschten Ligationsprodukt (**6b**) entspricht. Gleichzeitig ist die Abnahme der Peaks für die Edukte bei $t_r = 12.9$ min und $t_r = 14.1$ min zu erkennen. Allerdings wurde auch hier wieder eine Überlagerung der Edukt-/Produkt-Signale beobachtet. Jedoch war im Gegensatz zur vorherigen Signalüberlagerung des Ligationsproduktes (**6**) mit dem C-terminalen Peptid (**5**) (vgl. S.37, Abb. 15) diesmal eine minimale Überlagerung des N-terminalen Peptids (**1b**) mit dem Ligationsprodukt (**6b**) zu beobachten. Dieses Trenn- bzw. Reinigungsproblem konnte glücklicherweise nach Beendigung der Ligation durch anschließende Hydrolyse des nicht umgesetzten Thioesters (**1b**) zur Säure umgangen werden, indem der pH-Wert der Reaktionslösung erhöht wurde. Folglich konnten die Retentionszeiten von **1b** und **6b** verschoben werden (Abb. 21). Der Peak bei der Retentionszeit $t_r = 10.7$ min wird durch *p*-Acetamidothiophenol verursacht.

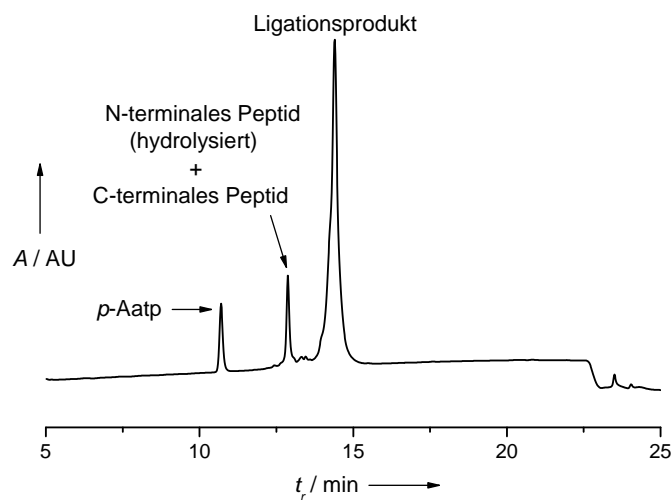


Abbildung 21. Alkalische Hydrolyse des Peptidthioesters (**1b**) zur Säure durch Erhöhung des pH-Wertes (mit einer wässrigen 0.1 mM NaOH-Lösung).

Nach anschließender präparativer Aufreinigung wurde das LZ1WW3-Ligationspeptid (**6b**) isoliert und aus Acetonitril/Wasser lyophilisiert. Abbildung 22 zeigt das aufgereinigte HPLC-Chromatogramm und das Massenspektrum des LZ1WW3-Ligationsproduktes (**6b**). Die im MALDI-ToF Spektrum gefundene Masse von 7921.9 m/z stimmte mit der berechneten Masse von 7921.0 g/mol überein (Abb. 22, B). Die erhaltene Menge an **6b** betrug 17 mg (2.2 μ mol), was bezogen auf die eingesetzte Menge von Peptidthioester (**1b**) (39 mg, 7.6 μ mol) und Cysteinyl-Peptid (**4b**) (25 mg, 8.3 μ mol) einer Ausbeute von 28% entspricht.

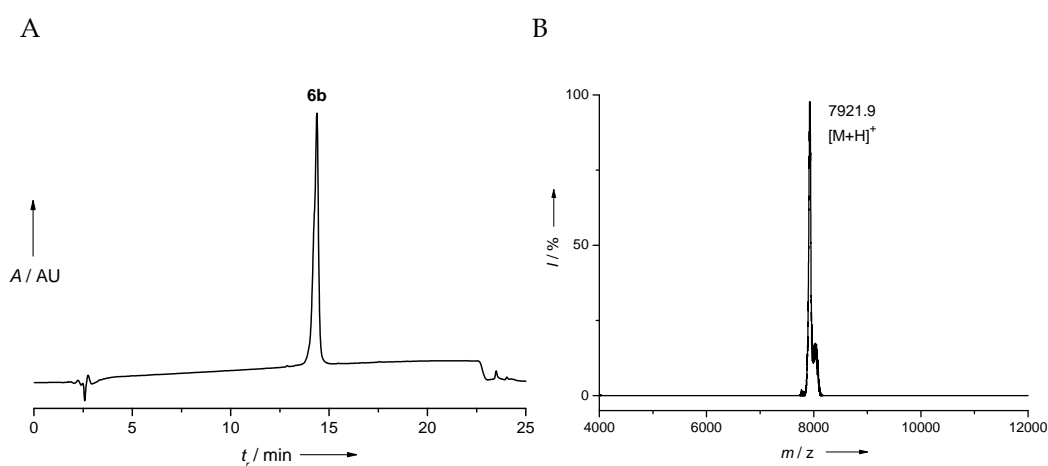


Abbildung 22. HPLC-Chromatogramm und MALDI-ToF Spektrum des LZ1WW3-Ligationsproduktes (**6b**). **A.** HPLC-Profil von **6b** bei einer Retentionszeit $t_r = 14.4$ min; **B.** MALDI-ToF von **6b** $m/z = 7921.9$ $[M+H]^+$

In Tabelle 4 sind alle synthetisierten Peptidsequenzen aufgelistet, die für die nachfolgenden Strukturuntersuchungen eingesetzt wurden. Die WW-Peptide (**3***) und (**4***) wurden im Hinblick auf die CD-Messungen ohne die N-terminale „CGG“-Sequenz synthetisiert (siehe Material und Methoden M1 und M2).

Name	Peptidsequenzen	AS
1	LZ1 ARMKQLEDKV ¹⁰ EELLSKNYHL ²⁰ ENEKARLEKL ³⁰ VA	32
2	LZ3 ARMKQLEDKV ¹⁰ EELLSKIYHN ²⁰ ENEVARLKKL ³⁰ VA	32
3*	WW2 AVSEWTEYKT ¹⁰ ANGKTYYYNN ²⁰ RTL ³⁰ ESTWEKP ³⁰ Q	31
4*	WW3 VATAPIPGTP ¹⁰ WCVVWTGDER ²⁰ VFFYNPTTRL ³⁰ SMWDR	35
6b	LZ1WW3 A ¹ RMKQLEDKV ¹⁰ EELLSKNYHL ²⁰ ENEKARLEKL ³⁰ VGGVATAPIP ⁴⁰ GTPWCVVWTG ⁵⁰ DERVFFYNPT ⁶⁰ TRLSMWDR	68
7	LZ3WW2 A ¹ RMKQLEDKV ¹⁰ EELLSKIYHN ²⁰ ENEVARLKKL ³⁰ VACGGAVSEW ⁴⁰ TEYKTANGKT ⁵⁰ YYNNRTLES ⁶⁰ TWEKPQ	66

Tabelle 4. Synthetisierte Peptide für die biophysikalischen Strukturuntersuchungen. Alle Peptide liegen als C-terminale Amide vor. * Im Hinblick auf die biophysikalischen Messungen wurden **3*** und **4*** ohne die N-terminale „CGG“-Sequenz synthetisiert.

3.5. Biophysikalische Charakterisierung der WW-Domänen funktionalisierten Leucin-Zipper Peptide

Die Ausbildung der nativen Struktur der modular aufgebauten Leucin-Zipper-WW-Peptide ist insofern essenziell, da nur die Ausbildung einer dreidimensionalen Sekundär- bzw. Tertiärstruktur zu einer biologischen Aktivität wie beispielsweise zur molekularen Selbsterkennung oder Protein-Interaktion führen kann. [102-104] Kurz gesagt: Nur in gefalteter Form sind Peptide biologisch aktiv. Die Struktur und Aktivität von Peptiden und Proteinen kann mit Hilfe biophysikalischer Methoden untersucht werden. Diese Methoden erlauben es, die in der vorliegenden Arbeit mittels chemischer Synthese (SPPS, NCL) generierten Peptide hinsichtlich ihrer strukturellen Eigenschaften zu analysieren.

In dieser Arbeit sollte das Faltungs-, Stabilitäts- und Assoziationsverhalten der WW-Domänen funktionalisierter Coiled Coil-Konstrukte untersucht werden. Hierbei sollten in erster Linie CD- und NMR-Messungen Aufschluss über die Konformation und Stabilität der zu untersuchenden Peptide liefern. Vor allem sollte auf die CD-Spektroskopie als Standardmethode zur Bestimmung der Sekundärstrukturelemente im Peptid und zur Untersuchung von Konformationsänderungen, die beispielsweise durch thermische Denaturierung, pH-Wert Änderungen oder Peptid-Ligand Wechselwirkungen hervorgerufen werden, zurückgegriffen werden. Um die Assoziation der Coiled Coils bzw. Wechselwirkungen zwischen den WW-Domänen mit ihren spezifischen Liganden zu untersuchen und thermodynamische Parameter, wie z.B. Dissoziationskonstanten zu bestimmen, sollte die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) angewendet werden.

Generell nehmen Coiled Coils in wässrigem Milieu eine α -helikale Struktur^[105] und WW-Domänen eine antiparallele, dreisträngige β -Faltblattstruktur^[106-108] ein und eignen sich daher als interessante Modelle für Proteinfaltungs- und Stabilitätsstudien. Dementsprechend müssten die LZWW-Peptide beide Strukturelemente, also sowohl einen α -helikalen, als auch einen β -Faltblatt-Anteil beinhalten. Aus diesem Grund wurden die jeweiligen CD-Spektren der einzelnen LZ- und WW-Peptide und die der LZWW-Ligationsprodukte aufgenommen und anschließend miteinander verglichen. Die Ergebnisse der biophysikalischen Untersuchungen der chemisch synthetisierten LZ-, WW- und LZWW-Peptide sind nachfolgend dargestellt.

3.5.1. CD-spektroskopische Untersuchungen der LZ3-, WW2- und LZ3WW2-Peptide

Die LZ3-, WW2- und LZ3WW2-Peptide wurden jeweils in gleichen Konzentrationen (30 μM) im Phosphatpuffer (siehe Material und Methoden) gelöst und die entsprechenden CD-Spektren unter identischen Bedingungen bei 4°C und pH 7.0 aufgenommen. Das Fern-UV CD-Spektrum des LZ3-Peptids (**2**) ist durch zwei Minima bei 208 und 222 nm charakterisiert, welche typisch für α -helikale Strukturen sind (Abb. 23). Während die Absorptionsbande bei 222 nm Hinweise über den α -helikalen Gehalt gibt, kann die bei 208 nm gelegene Absorptionsbande ein Merkmal für das Vorliegen einer einzel- oder mehrsträngigen Helix sein.^[88,109-111] Darüber hinaus liefert das Verhältnis der Elliptizitätswerte bei 222 nm und 208 nm Hinweise bezüglich der Oligomerisierung, welches für Coiled Coils als $[\theta]_{222}/[\theta]_{208} \geq 1$ und für isolierte Helices $[\theta]_{222}/[\theta]_{208} \leq 0.86$ bestimmt wurde.^[89] Diesbezüglich würde das LZ3-Peptid mit einem Elliptizitätsverhältnis von $[\theta]_{222}/[\theta]_{208} \geq 0.76$ als eine einzelne α -Helix, und nicht als Coiled Coil vorliegen, was eigentlich im Widerspruch zu den vorangegangenen Experimenten von Portwich *et al.* steht.^[64] Offensichtlich liegt hier aber das Gleichgewicht zwischen der einzelsträngigen α -Helix und des Homotrimers auf der Seite der α -helikalen Struktur. Mögliche Gründe für dieses Verhalten wären die Messbedingungen (z.B. pH-Wert, Temperatur, Puffer). Während die CD-Spektren in der Arbeit von Portwich *et al.* in TBS-Puffer bei Raumtemperatur und pH 8 aufgenommen wurden, wurden die CD-Experimente in der vorliegenden Arbeit in Phosphatpuffer bei 4°C und pH 7 durchgeführt.

Im Gegensatz zum LZ zeigt das CD-Spektrum des WW2-Peptids (**3***) eine positive Elliptizität um 230 nm (Abb. 23). Jedoch sind im vorliegendem WW2-Spektrum keine klassischen β -Faltblatt-Signale zu erkennen, die ein Minimum bei 217-218 nm und ein Maximum bei 195-197 nm aufweisen sollten. Generell unterscheiden sich die Fern-UV CD-Signale der WW-Domänen von denen, die für typische antiparallele β -Faltblatt-Strukturen bestimmt wurden.^[112-114] Das auffällige Maximum bei 230 nm lässt sich durch die Beiträge der aromatischen Seitenketten der Tryptophane und Tyrosine sowie deren räumliche Anordnung zueinander erklären.^[115,116] Demzufolge weist dieses Signal auf das Vorhandensein einer geordneten β -Faltblatt-Struktur und somit auf eine gefaltete WW-Domäne hin.

Des Weiteren liegen die N- und C-Termini der WW-Domäne im gefalteten Zustand ungeordnet vor, was die Ähnlichkeit mit einem *random coil*-Spektrum erklären würde (Minimum bei 195 nm und Maximum 212 nm).^[117]

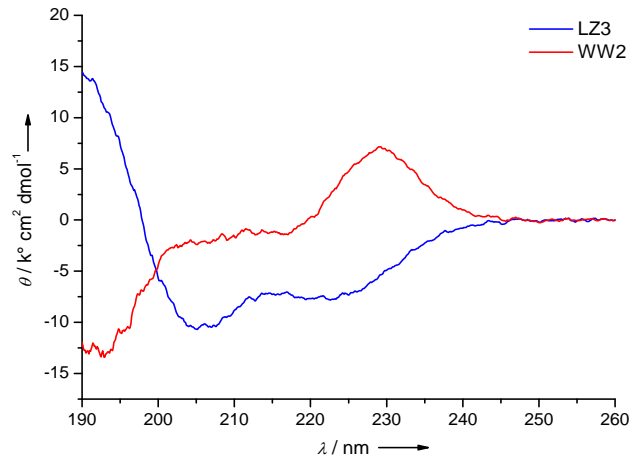


Abbildung 23. CD-Spektrum der isolierten LZ3- und WW2-Peptide (**2** und **3***) bei pH 7 ($c \sim 30 \mu\text{M}$).

Idealerweise sollte das CD-Spektrum des LZ3WW2-Ligationsprodukts (**7**) eine Kombination der Spektren mit α -helikalen und β -Falblatt Sekundärstrukturen darstellen. Wie erwartet wird das entsprechende CD-Spektrum des 66 Aminosäure langen Ligationsprodukts (**7**) durch zwei Minima um 206 nm und 220 nm sowie eine kleine positive Bande um 230 nm gekennzeichnet (Abb. 24, A). Auffällig ist, dass die molare Elliptizität bei 220 nm mit $-4.9 \text{ k}^\circ \text{ cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ deutlich geringer ist als die molare Elliptizität bei 206 nm von $-7.5 \text{ k}^\circ \text{ cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$. Somit liegt das molare Elliptizitätsverhältnis mit $[\theta]_{220}/[\theta]_{206} = 0.63$ unter den allgemein ermittelten Werten für Coiled Coils, was auf das Vorhandensein einer einzelsträngigen, α -helikalen Struktur schließen lässt, die vermutlich als Einzelstrang vorliegt. Zudem weist die leichte Verschiebung des Minimums von 208 nm auf 206 nm auf eine partielle Helixformation hin, d.h. das Peptid besitzt zusätzlich einen Anteil, der keine erkennbare Sekundärstruktur aufweist (*random coil*). Betrachtet man den Wellenlängenbereich um 230 nm ist ein Signal mit positiver Elliptizität zu erkennen, welches bereits für die isolierte WW2-Domäne (**3***) beschrieben wurde.

Wie aus Abbildung 24 hervorgeht, nimmt das Ligationprodukt (7) in Phosphatpuffer bei pH 7 und 4°C eine definierte räumliche Anordnung ein, welche die Summe der einzelnen α -helikalen und β -Faltblatt Spektren (additiver Effekt) darstellt. Beim Vergleich der LZ3- und LZ3WW2-Spektren miteinander ist zu erkennen, dass das CD-Signal von LZ3WW2 (7) (bezogen auf die Minima) im Vergleich zum CD-Signal von LZ3 (2) nicht so stark ausgeprägt ist (Abb. 24, B).

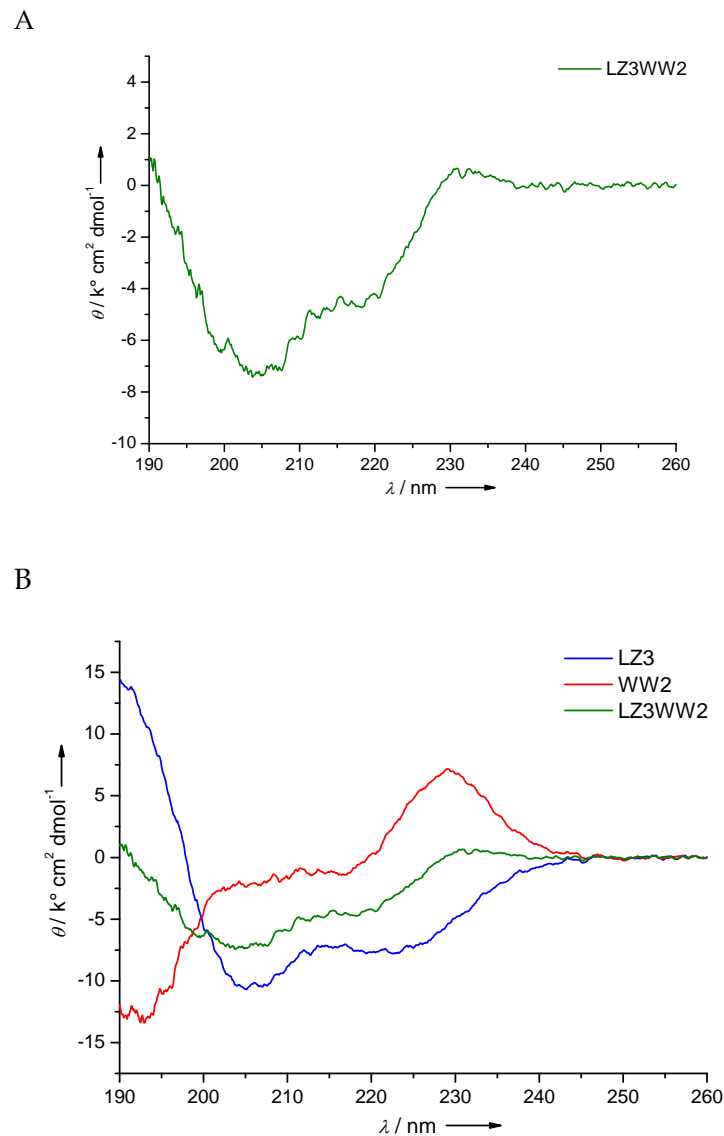


Abbildung 24. Fern-UV CD-Spektrum von LZ3, WW2 und LZ3WW2 bei pH 7.0 ($c \sim 30 \mu\text{M}$). **A.** CD-Spektrum des LZ3WW2-Peptids (7). **B.** CD-Spektrum der LZ3-, WW2- und LZ3WW2-Peptide (2, 3* und 7).

Eine Erklärung dafür wäre, dass der Helix-Anteil im LZ3WW2-Gesamtpeptid durch den β -Faltblatt- und *random coil*-Anteil entsprechend reduziert wird und dementsprechend nicht so stark ausgeprägt ist wie im isolierten LZ3-Peptid. Es sind auch keine streng getrennten Übergänge im LZ3WW2-Spektrum zu beobachten, da keine isolierten Sekundärstrukturen (α -Helix bzw. β -Faltblatt) vorliegen, sondern eine Mischung in der die Sekundärstrukturanteile unterschiedlich stark gewichtet sind. Analog führt der Sekundärstrukturbeitrag der Helix im LZ3WW2-Peptid zu einem Intensitätsverlust (Abnahme der mittleren molaren Elliptizitäten) des WW-typischen Signals bei 230 nm im Vergleich zur isolierten WW2-Domäne. Aufgrund der Überlappung der entsprechenden α -helikalen und β -Faltblatt-Signale resultiert ein breites Signal von 220 nm bis ca. 240 nm.

3.5.2. NMR-spektroskopische Strukturanalyse des LZ3WW2-Peptids

Zur Bestätigung der aus den CD-Spektren abgeleiteten β -Faltblatt-Struktur des WW-Segments im LZ3WW2-Peptid (**7**) wurden zusätzlich ^1H -NMR-Spektren von **7** und zum Vergleich von der isolierten WW2-Domäne (**3***) bei 279 K aufgenommen. In der Regel kann der Faltungsstatus einer WW-Domäne mit Hilfe von ^1H -NMR-Spektren bestimmt werden, da stabil gefaltete WW-Domänen charakteristische Signalmuster zwischen 9.0 und 9.6 ppm und im Bereich um 10 ppm im ^1H -NMR-Spektrum aufweisen.^[78,82-83] Dazu gehören, wie am Beispiel des Spektrums für die isolierte WW2-Domäne deutlich wird, die Indol-NH-Signale (Tryptophan-Seitenketten-Signale), welche die typischen chemischen Verschiebungen um 10 ppm zeigen (Abb. 25). Darüber hinaus umfasst der Bereich zwischen 9.0-9.6 ppm die Signale der amidischen Protonen des Peptidrückgrats bei gefalteten Peptiden. Je stabiler eine WW-Domäne ist, desto schärfer sind die Signale in diesem Bereich des Spektrums. Fehlen diese Signale, so liegt die WW-Domäne ungefaltet vor. Ein weiteres Merkmal für eine native Konformation sind hochfeldverschobene Protonensignale aliphatischer Gruppen (0-1.2 ppm).

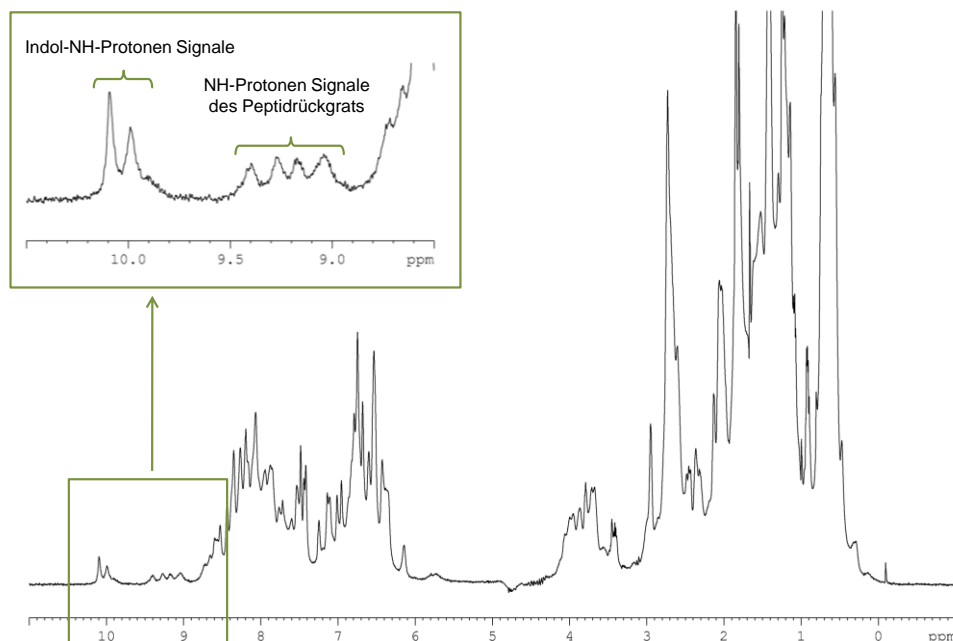


Abbildung 25. 1D ^1H -NMR Spektrum des im isolierten Zustand gefalteten WW2-Peptids (**3***).

Wie im Falle der gefalteten WW2-Domäne (3*) konnten für das LZ3WW2-Peptid (7) ebenfalls charakteristische Signale detektiert werden, die auf eine bestimmte räumliche Anordnung in einer definierten Tertiärstruktur zurückzuführen sind (Abb. 26).

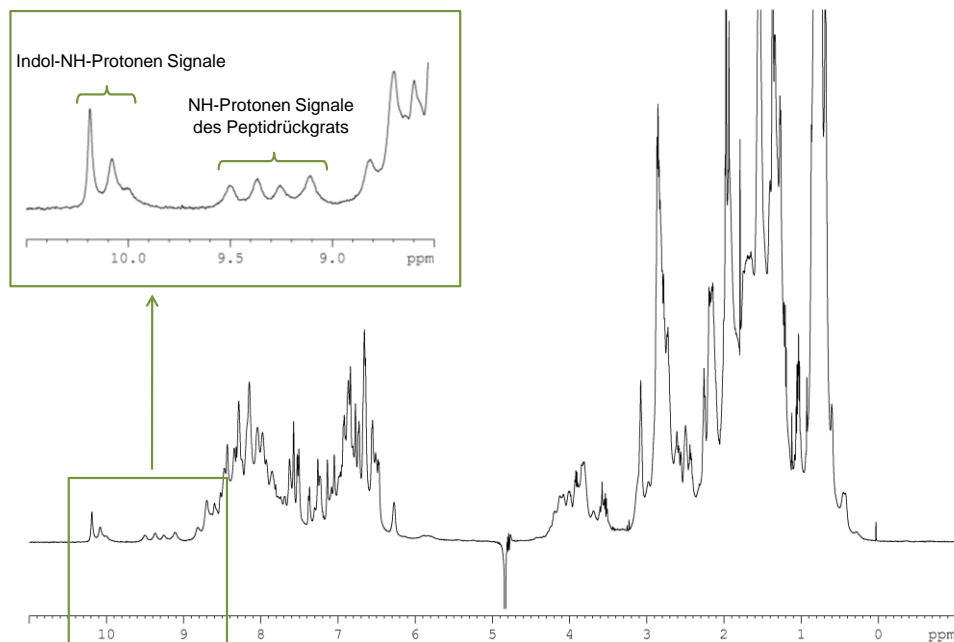


Abbildung 26. 1D ^1H -NMR Spektrum des LZ3WW2-Peptids (7). Im Spektrum oben links sind die chemischen Verschiebungen von 11 - 8.5 ppm dargestellt.

Das NMR-Spektrum des LZ3WW2-Peptids zeigt die signifikanten Peakmuster im Bereich der amidischen Protonen des Peptidrückgrats zwischen 9.0-9.6 ppm, sowie die beiden Indol-NH-Protonen der Tryptophan-Seitenketten bei einer chemischen Verschiebung um 10 ppm. Die gute Signaldispersion lässt auf eine stabile β -Faltblatt-Konformation der WW2-Domäne im LZ3WW2-Konstrukt schließen. Einhergehend mit den Ergebnissen, die mit Hilfe der CD-Spektroskopie ermittelt wurden, konnte das Vorliegen einer geordneten Struktur der Seitengruppen und somit eines gefalteten β -Faltblatt-Zustands des WW2-Segments im LZ3WW2-Peptid (7) nachgewiesen werden.

3.5.3. Untersuchungen zur thermischen Stabilität des LZ3WW2-Peptids

Ein klassisches Merkmal von gefalteten WW-Domänen in Fern-UV CD-Spektren ist die positive Elliptizität um 230 nm, welches in CD-Spektren denaturierter WW-Domänen nicht mehr vorhanden ist. Daher eignet sich die Signaländerung der Elliptizität bei dieser Wellenlänge besonders für Entfaltungs- bzw. Faltungsexperimente und kann CD-spektroskopisch verfolgt werden. Abbildung 27 zeigt die Veränderung des Circular dichroismus während der thermischen Entfaltung des LZ3WW2-Peptids (7). Bei 4 °C zeigt das WW-typische CD-Signal eine positive Elliptizität bei ca. 230 nm, die nach Erhöhung der Temperatur auf 90 °C nicht mehr vorhanden ist. Die Temperaturerhöhung hat also einen unmittelbaren Einfluss auf die Stabilität der WW-Domäne im LZ3WW2-Peptid (7). Die Abnahme des charakteristischen Signals im CD-Spektrum ist in diesem Fall ein Indiz für die Denaturierung des WW-Segments im Ligationseptid (7). Die thermische Denaturierung verläuft offenbar für beide Strukturelemente reversibel. Nach der Abkühlung von 90 °C auf 4 °C sind sowohl die Signale für α -Helices bei 206 nm und 220 nm, als auch ein verbreitetes Signal um 230 nm für die WW-Faltblattstruktur zu beobachten. Auch hier ist aufgrund der Überlappung mit dem entsprechenden α -helikalen Signal bei 220 nm die positive Elliptizität abgeflacht.

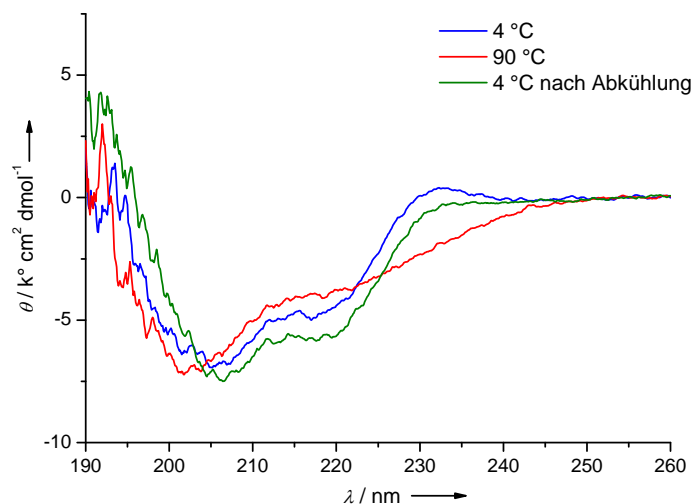
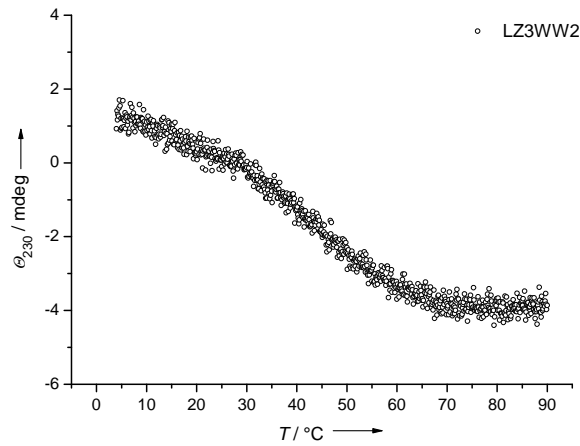


Abbildung 27. Veränderung des Circular dichroismus von LZ3WW2 (7) während der thermischen Entfaltung. Dargestellt sind die CD-Spektren des LZ3WW2-Peptids (7) bei 4 °C und 90 °C sowie nach Abkühlung von 90 °C auf 4 °C (pH 7, $c \sim 30 \mu\text{M}$).

Um zu überprüfen, ob die Anwesenheit der α -Helix die Stabilität der WW-Domäne im LZ3WW2-Konstrukt beeinträchtigt, wurden Entfaltungsexperimente an **7** und zum Vergleich an der isolierten WW2-Domäne (**3***) durchgeführt. Die thermische Denaturierung wurde in beiden Fällen in einem Temperaturbereich von 4-90 °C durch Verfolgung der absoluten Elliptizität des CD-Signals bei 230 nm ermittelt (Abb. 28). Der Kurvenverlauf der thermischen Entfaltung von **7** ist durch einen Signalabfall zwischen 4-30 °C und 30-60 °C gekennzeichnet. Von 70-90 °C bleibt der Verlauf der Elliptizität konstant (Abb. 28, A).

A



B

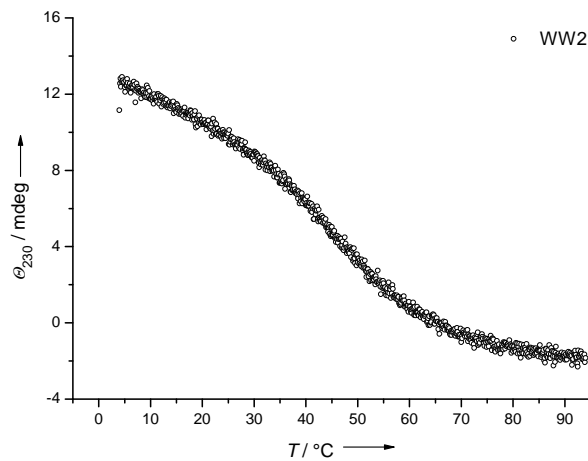


Abbildung 28. Thermische Entfaltung des LZ3WW2-Peptids (**7**) und der isolierten WW2-Domäne (**3***) verfolgt über die Änderung des CD-Signals bei 230 nm ($\sim 30 \mu\text{M}$, pH 7). **A.** CD-Spektrum des LZ3WW2-Peptids (**7**) bei 230 nm von 4-90 °C. **B.** CD-Spektrum der WW2-Domäne (**3***) bei 230 nm von 4-90 °C. Es sind die absoluten Elliptizitäten dargestellt.

Da das CD-Signal bei der gewählten Wellenlänge sowohl Signalbeiträge des β -Faltblatts als auch Beiträge der α -Helix enthält, lassen sich, wie aus Abb. 28 A ersichtlich wird, dementsprechend auch keine streng voneinander getrennten Übergänge beobachten. Für **7** wurde eine Entfaltungstemperatur von $T_m = 51.2\text{ °C}$ gemessen und im Vergleich dazu konnte für die isolierte WW2-Domäne (**3***) eine Entfaltungstemperatur von $T_m = 50.1\text{ °C}$ bestimmt werden. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass der Leucin-Zipper keinen wesentlichen Einfluss auf die thermische Stabilität der WW2-Domäne im LZ3WW2-Konstrukt (**7**) hat. Abbildung 29 zeigt zusammengefasst die CD-Spektren der einzelnen Temperaturmessungen (10-90 °C) des LZ3WW2-Peptids (**7**). Während die thermische Entfaltung des WW-Strukturanteils mit dem Verlust der Absorptionsbande bei 230 nm einhergeht, sind die für α -helikale Strukturen charakteristischen Minima noch bei hohen Temperaturen detektierbar.

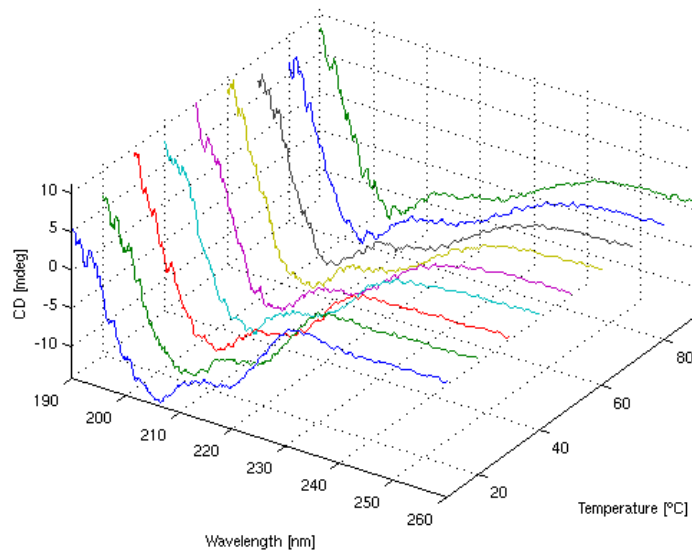


Abbildung 29. CD-Spektrum des LZ3WW2-Peptids (**7**) von 10-90° C bei pH 7.0 ($c \sim 30\ \mu\text{M}$).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die im LZ3WW2-Peptid (**7**) enthaltenen Strukturelemente (α -Helix und β -Faltblatt) sowohl unabhängig voneinander falten, als auch unabhängig voneinander denaturieren. Thermische Entfaltungsstudien ergaben, dass der α -helikale Leucin-Zipper einen minimalen Einfluss auf die Stabilität der WW2-Domäne hat.

3.5.4. Untersuchungen zur pH-abhängigen Stabilität des LZ3WW2-Peptids

Obgleich die Primärstruktur den nativen Faltungszustand eines Peptids bestimmt, sind die konformationellen Eigenschaften wie beispielsweise die Ausbildung bzw. der Erhalt der nativen Sekundärstruktur von verschiedenen Parametern (z.B. pH-Wert, Temperatur, Konzentration, Lösungsmittel) abhängig.^[118] Um die voneinander unabhängige Faltung beider Strukturelemente (α -Helix und β -Faltblatt) sowie die konformationelle Stabilität des LZ3WW2-Peptids genauer zu untersuchen, wurden zunächst CD-Messungen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Hierfür wurde das LZ3WW2-Peptid (7) jeweils unter sauren, neutralen und basischen Bedingungen bei gleichbleibender Temperatur (4 °C) und Konzentration (30 μ M) vermessen. Die CD-Experimente bei unterschiedlichen pH-Werten bekräftigten das Bild von zwei autonomen Strukturelementen im Ligationskonstrukt (7) sowohl im Hinblick auf die Stabilität der α -Helix als auch der β -Faltblattstruktur. Wie aus den CD-Spektren in Abbildung 30 hervorgeht, weist die WW-Domäne im LZ3WW2-Peptid unter sauren bis neutralen Bedingungen (pH 4 bis pH 7) eindeutig ein für β -Faltblattstrukturen typisches Signal um 230 nm auf, während es unter basischen Bedingungen (pH 9) nicht beobachtet werden kann (Abb. 30, A). Gleiches Verhalten lässt sich ebenso im CD-Spektrum der isolierten WW2-Domäne (3*) beobachten (Abb. 30, C). Im Gegensatz dazu zeigt das Leucin-Zipper-Segment im LZ3WW2-Peptid ein konträres Verhalten. Während für pH-Werte ≤ 6 keine typischen α -helikalen Signale beobachtet werden können, zeigt das CD-Spektrum bei pH 9 die für α -helikale Strukturen charakteristischen und gut ausgeprägten Minima bei 208 nm und 220 nm (Abb. 30, A). Dieses Verhalten lässt sich auch für die isolierte LZ3-Variante (2) beobachten (Abb. 30, B). In Anbetracht dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass die β -Faltblattstruktur im sauren pH-Bereich stabil und im basischen instabil ist. Umgekehrt zeigen die CD-Experimente für die α -Helix die größte Stabilität bei pH 9, die durch negativere molare Elliptizitäten bei 220 nm gekennzeichnet ist und mit einer Erhöhung der Helizität einhergeht. Dieses Verhalten der pH-induzierten Änderung der Sekundärstruktur lässt sich ebenso in den CD-Spektren der isolierten Leucin Zipper- bzw. WW-Domänen beobachten (Abb. 30, B und C).

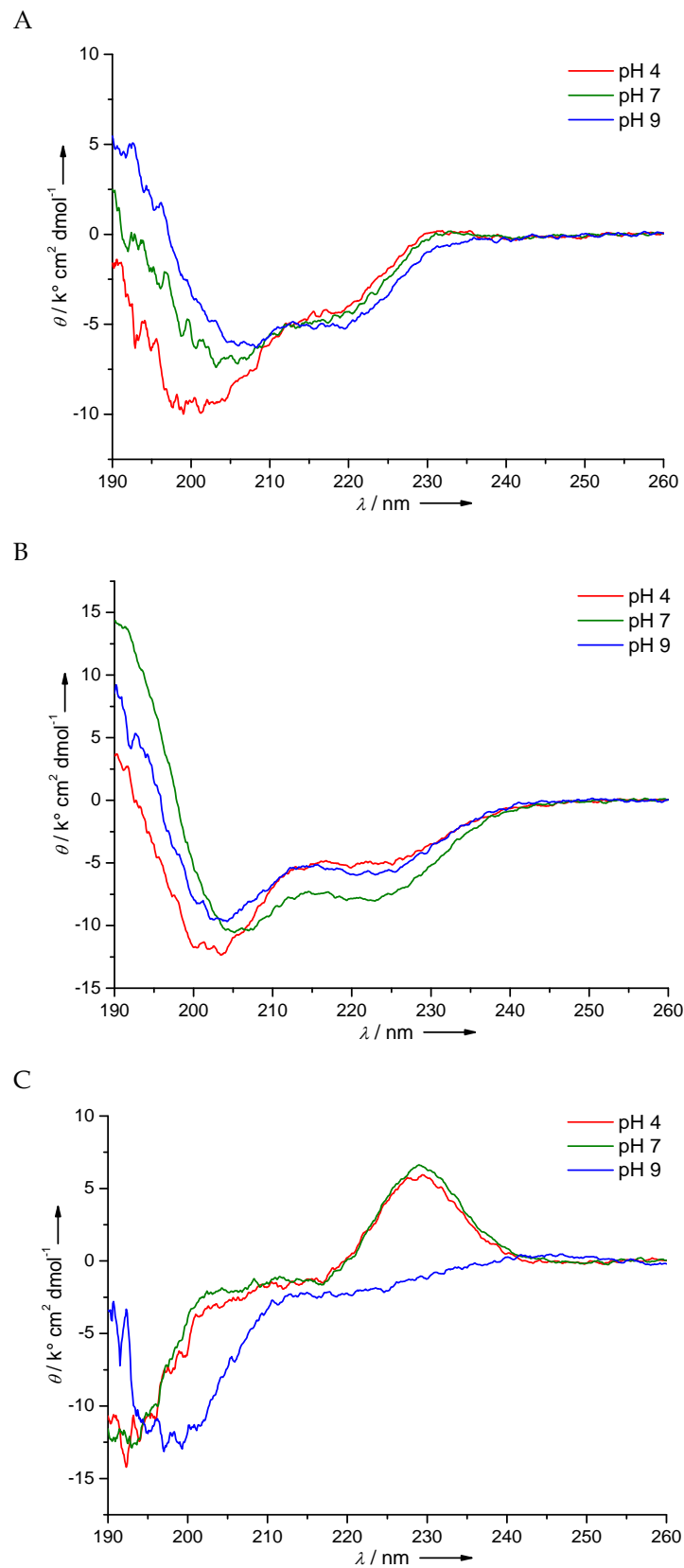


Abbildung 30. CD-Spektren der einzelnen LZ3WW2-, LZ- und WW-Peptide (7, 2 und 3*) bei unterschiedlichen pH-Werten (4 °C, $c \sim 30 \mu\text{M}$). **A.** CD-Spektrum von 7 bei pH 4, 7 und 9. **B.** CD-Spektrum von 2 bei pH 4, 7 und 9. **C.** CD-Spektrum von 3* bei pH 4, 7 und 9.

Die pH-Abhängigkeiten der mittleren molaren Elliptizitäten bei 230 nm und 220 nm des LZ3WW2-Peptids (7) lassen sich in der nachfolgenden Abbildung anschaulich darstellen. Die Erhöhung des pH-Wertes bei 230 nm geht mit einer rapiden Abnahme der molaren Elliptizität einher, welche höchstwahrscheinlich aus einer Änderung oder dem Verlust der β -Faltblatt-Konformation im WW-Segment des LZ3WW2-Peptids resultiert (Abb. 31, A). Bekanntermaßen wird die WW-Struktur hauptsächlich durch die Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den β -Strängen des Faltblatts stabilisiert. Basische Bedingungen scheinen hier einen β -Faltblatt-destabilisierenden Beitrag zu leisten, indem die Ausbildung von H-Brücken gestört wird. Obleich die molare Elliptizität bei 220 nm ebenfalls mit steigendem pH-Wert der Lösung durch eine Abnahme gekennzeichnet ist, bewirkt die Änderung der molaren Elliptizität bei 220 nm in diesem Fall aber eine Erhöhung der Helizität (Abb. 31, B).

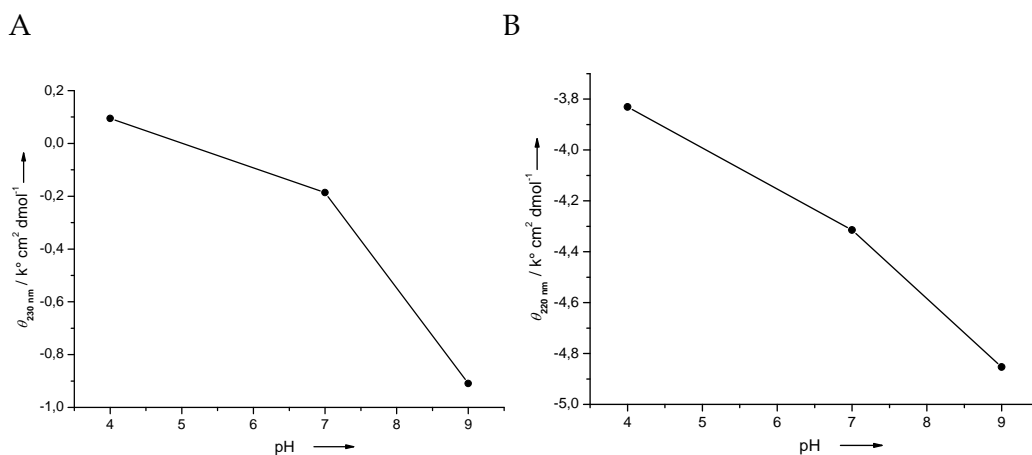


Abbildung 31. Molare Elliptizitäten in Abhängigkeit vom pH-Wert für das LZ3WW2-Peptid (7) bei 4 °C (~ 30 µM). A. pH-Abhängigkeit der molaren Elliptizität von 7 bei 230 nm (β -Faltblatt Signal). B. pH-Abhängigkeit der molaren Elliptizität von 7 bei 220 nm (α -helikales Signal).

Neben den elektrostatischen und van-der-Waals-Wechselwirkungen wird die Faltung von Peptiden u.a. durch Wasserstoffbrücken-Bindungen vermittelt. Während diese hauptsächlich die β -Faltblatt-Struktur stabilisieren, ist die Faltung und Stabilität der Coiled Coils durch zahlreiche inter- und intrahelikale Wechselwirkungen, wie hydrophobe „packing effects“ und ionische Interaktionen bedingt. Auf diese kann

eine Änderung des pH-Wertes unterschiedlichen Einfluss nehmen.^[119,120] Die Rolle der interhelikalen ionischen Interaktionen wirft jedoch nach wie vor Fragen auf und ist noch nicht ganz verstanden. Die Komplexität der Interaktionen in Coiled Coils zeigt sich darin, dass die meisten Experimente immer noch mit Modell-Peptiden durchgeführt werden.^[109,119] In den vergangenen Jahren rückten daher besonders Studien zur Untersuchung der interhelikalen Wechselwirkungen von α -helikalen Coiled Coils in den Fokus, welche neben Untersuchungen zur Stabilität auch solche zur Oligomerisierung umfassen. Beispielsweise konnte in verschiedenen Experimenten mit Modellpeptiden gezeigt werden, dass die interhelikalen ionischen Wechselwirkungen zur Ausbildung von Coiled Coil Formationen nicht essentiell sind, obwohl sie die Bildung von Hetero- gegenüber Homo-Assoziationen steuern können.^[89]

Zusammengefasst sind für die Ausbildung und Stabilität der Sekundärstruktur die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen entscheidend, die jedoch durch zahlreiche Faktoren, wie beispielweise pH-Wert, Temperatur, Konzentration etc. beeinflusst werden. Hinzu kommt, dass die Seitenketten der Aminosäuren ausschlaggebend für das Säure-Base-Verhalten und die damit verbundenen Konformationsänderungen von Peptiden sind. Aufgrund dieser enormen Vielzahl von möglichen Wechselwirkungen im Coiled Coil Peptid ist es an dieser Stelle nicht möglich, anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente eine eindeutige Erklärung für die beobachteten pH-abhängigen Konformationsänderungen im LZ3WW2-Peptid (7) zu geben.

3.5.5. Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Stabilität des LZ3WW2-Peptids

Der Einfluss der Peptidkonzentration auf die Sekundärstruktur im LZ3WW2-Ligationsprodukt (7) wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht. Hierfür wurde 7 bei drei verschiedenen Konzentrationen (10, 30 und 50 μM) vermessen. Aus dem Kurvenverlauf der CD-Spektren für das α -helikale Signal folgt eine Änderung der molaren mittleren Elliptizitäten bei 208 nm sowie 220 nm mit zunehmender Konzentration (Abb. 32). Während die für α -helikale Strukturen typischen Minima mit steigender Konzentration intensiver werden, nimmt das für β -Faltblatt-Strukturen charakteristische Maximum bei 220 nm mit zunehmender Konzentration ab (Abb. 32).

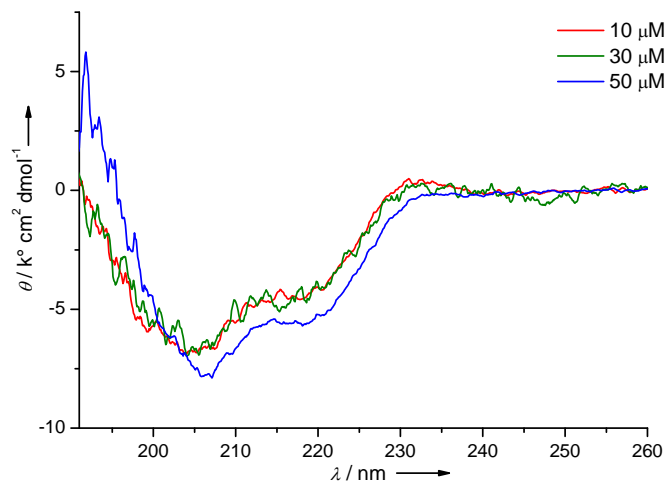


Abbildung 32. CD-Spektren des LZ3WW2-Peptids (7) bei drei unterschiedlichen Konzentrationen von 10, 30 und 50 μM (4 $^{\circ}\text{C}$ und pH 7).

In Abbildung 33 sind die mittleren molaren Elliptizitäten in Abhängigkeit von den verschiedenen Peptidkonzentrationen für das LZ3WW2-Peptid (7) bei einer Wellenlänge von 230 nm bzw. 220 nm zusammengefasst. Während eine Konzentrationserhöhung von 10 auf 30 μM zur starken Abnahme der Elliptizität bei 230 nm führt (Abb. 33, A), führt die gleiche Erhöhung der Konzentration zu keinen bzw. sehr geringen Änderungen der mittleren molaren Elliptizität bei einer Wellenlänge von 220 nm (Abb. 33, B).

Erst ab einer Konzentration von 30 μM findet ein auffällig starker Abstieg der molaren Elliptizität statt, welcher in diesem Fall auf eine Erhöhung des α -helikalen Gehalts hindeutet (Abb. 33, B). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die intermolekulare Wechselwirkung der Helices bei höheren Konzentrationen. Denn bei Helix-Helix-Wechselwirkungen kann es zu einem Intensitätsgewinn der Minima im CD-Spektrum kommen, da die Chromophore in einer Helix miteinander gekoppelt sind, was zu einer stärkeren Absorption führt.^[121] Letzteres scheint in diesem Fall also nicht unwahrscheinlich, weil die Zunahme der Signalintensität bei höheren Konzentrationen auftritt. Die Abnahme der mittleren molaren Elliptizität bei 230 nm mit zunehmender Konzentration kann durch die Überlappung des WW-typischen Maximums mit dem negativen Minimum bei 220 nm resultieren. Andererseits könnte die Verringerung der positiven Bande um 230 nm aber auch auf den Verlust der für WW-Domänen typischen β -Faltblatt-Struktur durch Aggregation hindeuten. Studien von Ferguson *et al.* zeigen, dass die WW2-Domänen in höheren Konzentrationen zur Bildung von Protofilamenten neigen,^[122] auf die im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht näher eingegangen wurde, da alle CD-Experimente mit niedrigen Konzentration (30 μM) durchgeführt wurden. Zur Untersuchung von Aggregaten können beispielsweise Röntgenbeugungs-, Lichtstreuungs- oder Einfärbungsexperimente durchgeführt werden.^[123]

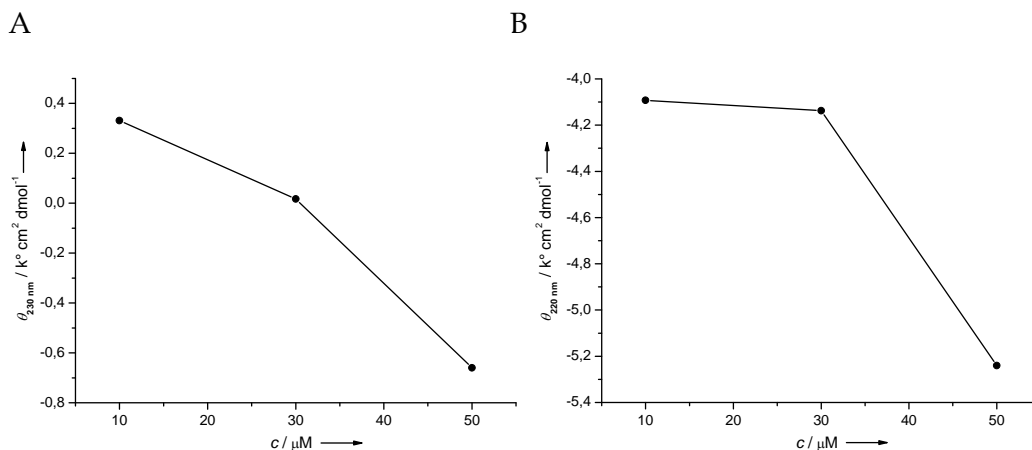


Abbildung 33. Molare Elliptizitäten in Abhängigkeit von der Konzentration für das LZ3WW2-Peptid (7) bei 10, 30 und 50 μM (4 $^{\circ}\text{C}$, pH 7). **A.** Konzentrationsabhängigkeit der molaren Elliptizität von 7 bei 230 nm (β -Faltblatt Signal). **B.** Konzentrationsabhängigkeit der molaren Elliptizität von 7 bei 220 nm (α -helikalen Signal).

3.5.6. CD-spektroskopische Untersuchungen der LZ1-, WW3- und LZ1WW3-Peptide

Die LZ1-, WW3- und LZ1WW3-Peptide (**1**, **4*** und **6b**) wurden jeweils in einer Konzentration von 30 μM in Phosphatpuffer bei pH 7.0 und 4 $^{\circ}\text{C}$ vermessen. Wie zu erwarten, zeigt das Fern-UV CD-Spektrum des LZ1-Peptids (**1**) ein charakteristisches CD-Spektrum, bedingt durch eine α -helikale Sekundärstruktur, welches durch zwei ausgeprägte Minima (208 und 222 nm) charakterisiert ist (Abb. 34). Das Elliptizitätsverhältnis von $[\theta]_{222}/[\theta]_{208} = 0.76$ deutet auf das Vorliegen einer einzelsträngigen α -Helix hin, welches mit den vorangegangenen Experimenten von Portwich *et al.*, in denen die LZ1-Variante als eine einzelsträngige α -helikale Struktur charakterisiert wurde, übereinstimmt.^[64] Das CD-Spektrum des WW3-Peptids (**4***) zeigt im Gegensatz zur gefalteten WW2-Domäne (**3***) (vgl. Abb. 23) keine positive Bande um 230 nm, sondern zwei schwache Minima bei ca. 211 und 229 nm. Das CD-Signal ähnelt auf den ersten Blick zwar dem eines helixbedingten CD-Spektrums, kann jedoch aufgrund der schlecht ausgeprägten Signale und erheblich abweichenden Wellenlängen nicht als solches definiert werden. Zudem deutet die relativ geringe Signalintensität auf eine nicht definierbare Struktur bzw. einen sehr geringen Anteil an geordneten Sekundärstrukturelementen hin, so dass dieses Spektrum keine Aussage über die Konformation des WW3-Peptids (**4***) in Lösung zulässt.

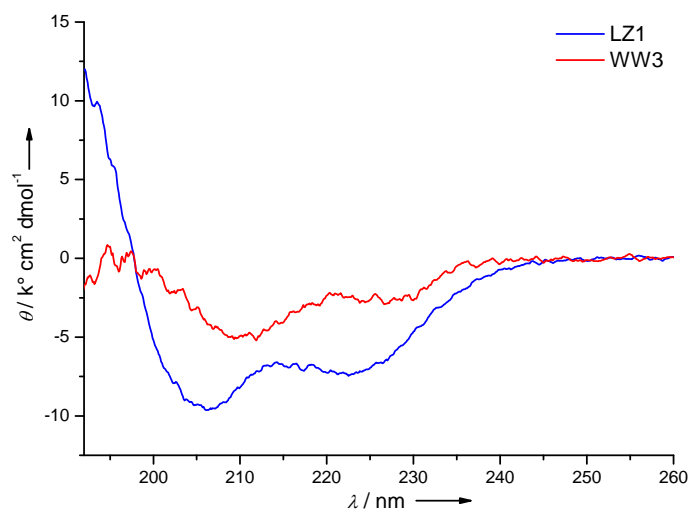


Abbildung 34. CD-Spektrum der isolierten LZ1- und WW3-Peptide (**1** und **4***) bei pH 7 ($c \sim 30 \mu\text{M}$).

Obgleich die synthetisierte WW3-Sequenz (**4***) die gesamte dreisträngige β -Faltblatt-Region umfasst (vgl. S.14, Abb. 6 C und Tabelle 4), zeigt dieses Ergebnis, dass das isolierte Peptid unter den vorherrschenden Bedingungen trotzdem keine geordnete Struktur einzunehmen scheint und deckt sich mit den vorherigen von Otte *et al.* durchgeführten Faltungsuntersuchungen.^[83] Die Auswahl der unstrukturierten WW3-Domäne für die Verknüpfung mit der Leucin-Zipper Variante 1 basierte auf zwei wesentliche Fragestellungen:

1. Welchen Einfluss hat ein nicht gefaltetes WW-Segment auf die α -helikale Sekundärstruktur des Leucin-Zippers-Segments im LZ1WW3-Zielpeptid?
2. Kann das α -helikale LZ-Segment eventuell die Ausbildung einer β -Faltblattstruktur des ungefalteten WW3-Segments im LZ1WW3-Peptidkonstrukt induzieren?

Interessanterweise haben He *et al.* 2009 eine NMR-Struktur der WW3-Domäne des TCERG1-Proteins in der Protein-Datenbank (PDB: 2DK7) veröffentlicht, aus der hervorgeht, dass sich C-terminal nach der dreisträngigen β -Faltblatt-Region ein kurzes, α -helikales Segment anschließt (siehe S. 13, Abb. 6, C).^[81] Vermutlich trägt dieser Bereich zur Ausbildung einer geordneten β -Faltblatt-Konformation bei, welcher durch die Wechselwirkung mit der Helix stabilisiert wird. Im Prinzip könnte daher eine Verknüpfung des WW3-Peptids mit dem α -helikalen Leucin-Zipper (**1**) zu einer Strukturinduzierung der WW3-Domäne führen. Demnach müsste im CD-Spektrum des LZ1WW3-Ligationspeptids (wie auch beim LZ3WW2-Peptid) neben einem helikalen Signal auch ein WW-typisches Maximum bei 230 nm detektiert werden. Allerdings zeigt das CD-Spektrum des Ligationsproduktes (**6b**) neben den charakteristischen α -helikalen Banden kein typisches WW-Signal bei 230 nm (Abb. 35, A). Somit wird durch die kovalente N-terminale Verknüpfung mit dem α -helikalen Leucin-Zipper-Peptid (**1**) keine Faltung der WW3-Domäne induziert. Umgekehrt zeigen die CD-Experimente, dass das unstrukturierte WW3-Segment im LZ1WW3-Peptid aber auch keinen destabilisierenden Einfluss auf die α -helikale Gesamtstruktur des Ligationspeptids (**6b**) zu haben scheint. Die CD-Spektren der LZ1-, WW3- und LZ1WW3-Peptide sind in Abbildung 35 B dargestellt.

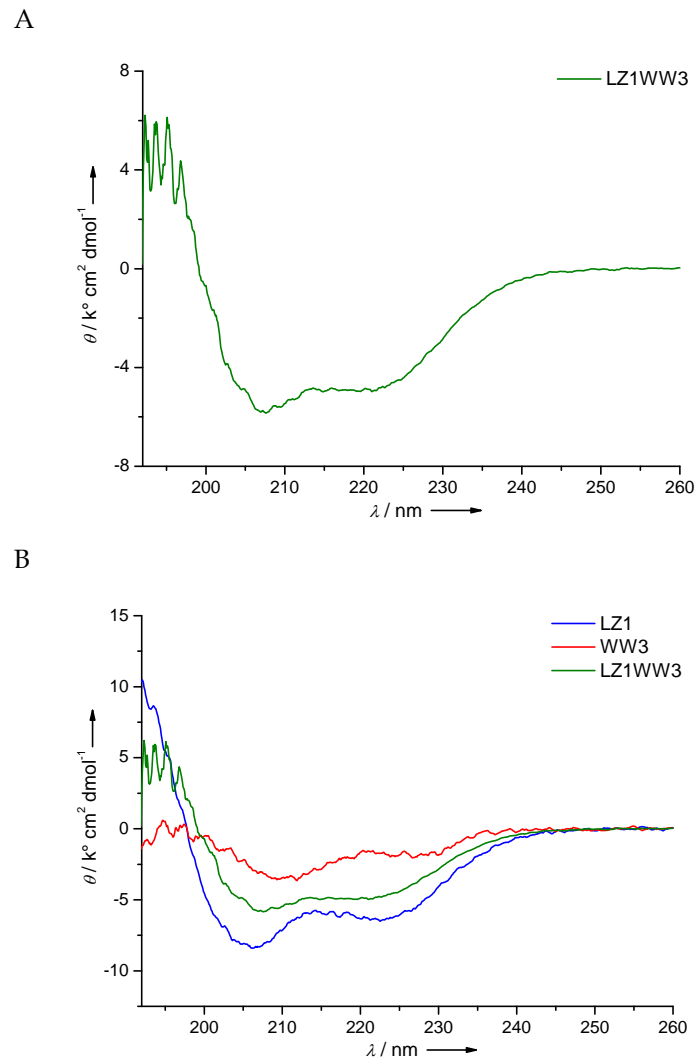


Abbildung 35. Fern-UV CD-Spektrum von LZ1, WW3 und LZ1WW3 bei pH 7.0 ($c \sim 30 \mu\text{M}$). **A.** CD-Spektrum des LZ1WW3-Peptids (**6b**). **B.** CD-Spektrum der L1-, WW3- und LZ1WW3-Peptide (**1**, **4*** und **6b**).

Desweiteren wurden auch für das LZ1WW3-Peptid (**6b**) pH- bzw. Konzentrations-Experimente bezüglich einer Änderung der Konformation durchgeführt, die für das LZ1-Segment im LZ1WW3-Peptid (**6b**) gleiche Ergebnisse lieferten, wie die entsprechenden Experimente für das LZ3-Segment im LZ3WW2-Peptid (**7**). Aus diesem Grund werden die Ergebnisse an dieser Stelle nicht gezeigt.

3.5.7. NMR-spektroskopische Strukturanalyse des LZ1WW3-Peptids

Das NMR-Spektrum des LZ1WW3-Peptids (**6b**) zeigte im Gegensatz zur gefalteten LZ3WW2-Variante (**7**) (vgl. S.52, Abb. 26) keine charakteristischen Signale bei den entsprechenden chemischen Verschiebungen, da weder die Indol-NH-Signale der Tryptophanseitenketten um 10 ppm noch die Amid-Protonen Signale zwischen 9.0-9.6 ppm detektiert werden konnten (Abb. 36).

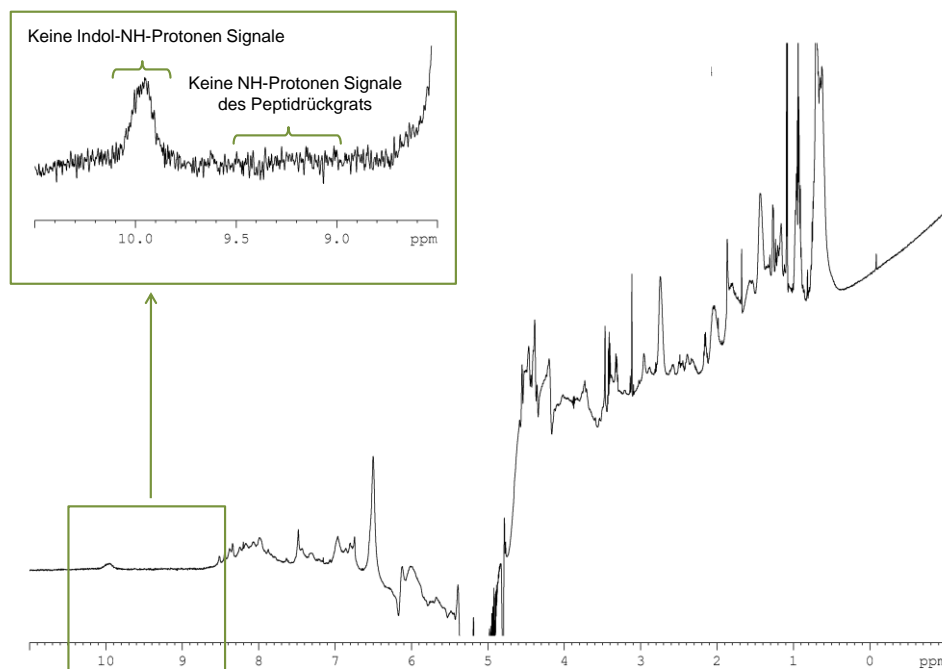


Abbildung 36. 1D ¹H-NMR Spektrum des ungefalteten WW-Segments im LZ1WW3-Peptid (**6b**). Im Spektrum oben links fehlen die charakteristischen Signale für gefaltete WW-Domänen.

Die in den CD-Messungen beobachteten Ergebnisse wurden somit anhand der NMR-Messung bestätigt. Folglich scheint der α -helikale Leucin-Zipper keinen stabilisierenden bzw. faltungsinduzierenden Einfluss auf die ungefaltete WW3-Domäne im LZ1WW3-Konstrukt zu haben.

3.5.8. CD-spektroskopische Untersuchungen zur Assoziation der LZWW-Peptide

Die assoziativen Eigenschaften der einzelnen GCN4 LZ-Varianten (LZ1 und LZ3) wurden von Portwich *et al.* mittels SPOT-Technologie und biophysikalischer Methoden untersucht, wobei ein Muster von homo- und heteromeren Assoziationen beobachtet wurde (Abb. 5).^[64] Dabei wurden zwischen den LZ1- und LZ3-Varianten heterospezifische Assoziationen beobachtet und mittels analytischer Ultrazentrifugation (AUZ) und CD-Spektroskopie der Coiled Coil Charakter dieser Assoziationen bestätigt. In der vorliegenden Arbeit wurde die heteromere Assoziation nochmals belegt, indem zunächst CD-Spektren der einzelnen Leucin-Zipper-Varianten LZ1 (1) und LZ3 (2), als auch ein 1:1 Gemisch beider Peptide [LZ1+LZ3] aufgenommen wurden. Das CD-Spektrum von [LZ1+LZ3] zeigt einen typischen α -helikalen Verlauf mit zwei ausgeprägten Minima, welches deutlich unter den beiden isolierten LZ1- und LZ3-Varianten liegt (Abb. 37, A). Im Vergleich zu den Signalen der einzelnen LZ-Peptiden ist das [LZ1+LZ3]-Signal bei 222 nm stärker ausgeprägt und das Elliptizitätsverhältnis beträgt ($[\theta]_{222}/[\theta]_{208} = 0.9$). Zudem müsste die gemessene CD-Kurve mit der berechneten (theoretischen) CD-Kurve übereinstimmen, wenn keine molekulare Interaktion (also Coiled Coil-Bildung) zwischen LZ1 und LZ3 im [LZ1+LZ3]-Gemisch vorliegen würde, da das theoretische Spektrum lediglich die Summe beider isolierten Spektren darstellt. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse eine Steigerung des α -helikalen Anteils im [LZ1+LZ3]-Komplex, welche auf die Bildung eines heteromeren Coiled Coils schließen lässt. In Analogie zu den einzelnen GCN4-Leucin-Zipper Varianten sollten die beiden Ligationskonstrukte LZ1WW3 und LZ3WW2 nach einer äquimolaren Mischung theoretisch ebenfalls einen heteromeren [LZ1WW3+LZ3WW2]-Komplex bilden. Das entsprechende [LZ1WW3+LZ3WW2]-Spektrum zeigt wie erwartet die für α -Helices spezifischen Absorptionsminima bei 220 nm und 208 nm (Abb. 37, B). Im Vergleich zu den isolierten Einzelspektren LZ1WW2 bzw. LZ3WW2 ist das Signal im [LZ1WW3+LZ3WW2]-Spektrum deutlich zu negativeren Elliptizitäten verschoben. Auch hier lässt sich die stark ausgeprägte negative Bande bei 220 nm auf eine Zunahme der Helizität zurückzuführen und die Ausbildung eines Coiled Coil Motivs vermuten.

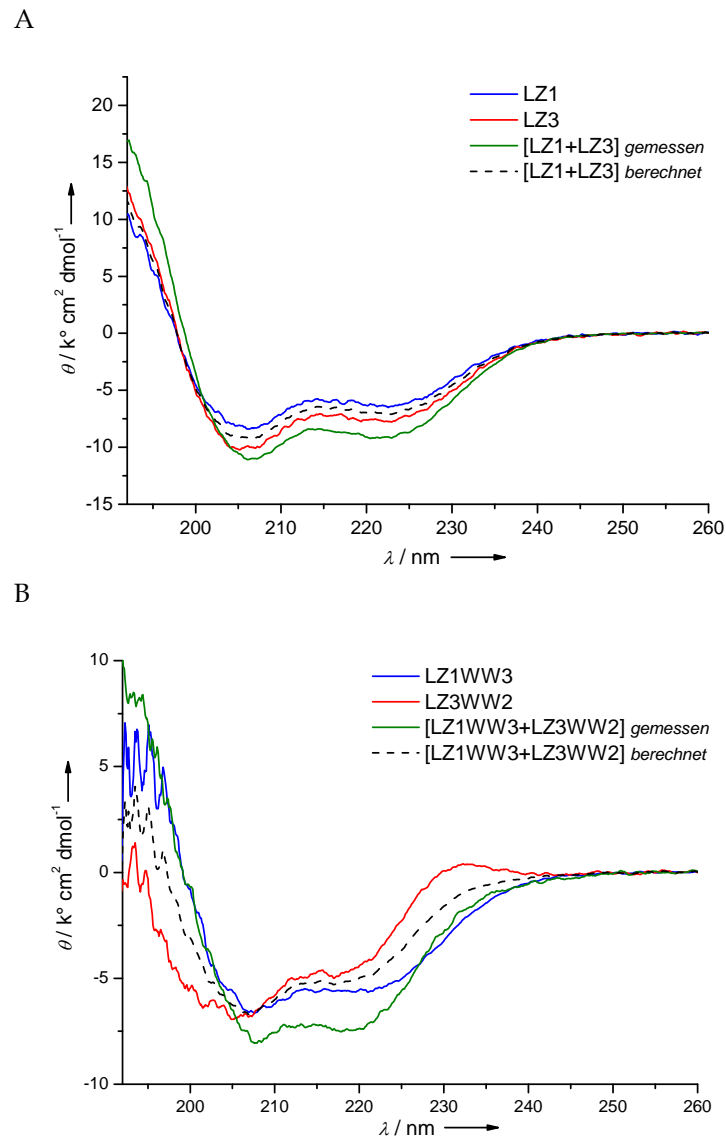


Abbildung 37. Fern-UV CD-Spektrum der LZ- und LZWW-Peptide bei pH 7.0 ($c \sim 30 \mu\text{M}$). **A.** CD-Spektrum der LZ-, LZ3-Peptide (**1**, **2**) und einer äquimolaren Mischung aus LZ1+LZ3. **B.** CD-Spektrum der LZ1WW3-, LZ3WW2-Peptide (**6b**, **7**) und einer äquimolaren Mischung aus LZ1WW3+ LZ3WW2. Die theoretische Summe der beiden LZ1WW3- und LZ3WW2-Einzelspektren ist gestrichelt dargestellt. Das gemessene Spektrum unterscheidet sich deutlich vom theoretischen. Dies ist auf eine Interaktion von **6b** mit **7** zurückzuführen.

Anhand des Vergleichs des experimentellen CD-Spektrums mit dem theoretischen CD-Spektrum und einem Elliptizitätsverhältnis von $[\theta]_{220} / [\theta]_{208} = 0.9$, welches mit dem Elliptizitätsverhältnis für den [LZ1+LZ3]-Komplex übereinstimmt, kann man auf eine Interaktion der LZ1WW3- und LZ3WW2-Peptide im äquimolaren Gemisch schließen, die mit der Ausbildung einer Coiled Coil Struktur einhergeht.

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden CD-Spektren der synthetisierten LZWW-Ligationspeptide, dass sich sowohl das Peptid LZ1WW3 (**6b**) als auch LZ3WW2 (**7**) im Circular dichroismus wie die jeweilige Summe der zwei voneinander unabhängigen LZ- bzw. WW-Segmente verhalten. D.h. die gefalteten bzw. ungefalteten WW-Segmente haben keinen Einfluss auf die Struktur der LZ-Segmente und umgekehrt. Außerdem ist im CD-Spektrum der äquimolaren Mischung [LZ1WW3+LZ3WW2] das α -helikale Signal intensiver, was schlussfolgern lässt, dass eine Zunahme der Helizität aufgrund einer Oligomerisierung der einzelnen LZWW-Peptide zu einem heteromeren Coiled Coil Komplex stattgefunden hat. Die Abnahme des Absorptionsmaximums bei 230 nm im CD-Spektrum des [LZ1WW3+ LZ3WW2]-Komplexes ist auf eine starke Überlappung mit der negativen Bande bei 220 nm zurückzuführen und nicht auf den Verlust der β -Faltblatt-Struktur. Letzteres konnte im folgenden Kapitel NMR-spektroskopisch bekräftigt werden.

3.5.9. NMR-spektroskopische Strukturanalyse des [LZ1WW3+LZ3WW2]-Komplexes

Im Fern-UV CD-Spektrum von [LZ1WW3+LZ3WW2] konnte zwar der typische α -helikale Signalverlauf von Coiled Coils beobachtet werden, jedoch wies das Spektrum überraschenderweise kein Maximum bei 230 nm auf, welches als charakteristisches Merkmal für gefaltete WW-Domänen beschrieben wird.^[106] Infolgedessen sollte die Aufnahme eines ^1H -NMR-Spektrums Aufschluss über den Faltungszustand der im LZ3WW2-Peptid kovalent gebundenen WW2-Segments im [LZ1WW3+LZ3WW2]-Komplex geben. Das aufgenommene NMR-Spektrum gleicht dem des LZ3WW2-Peptids bzw. der isolierten WW2-Domäne (vgl. S. 51-52) und zeigt erfreulicherweise die für WW-Domänen charakteristischen Faltungssignale (Abb. 38). Somit konnte mittels der NMR-Messung gezeigt werden, dass im [LZ1WW3+LZ3WW2]-Coiled Coil Komplex das WW2-Segment in einem gefalteten β -Faltblatt-Zustand vorliegt.

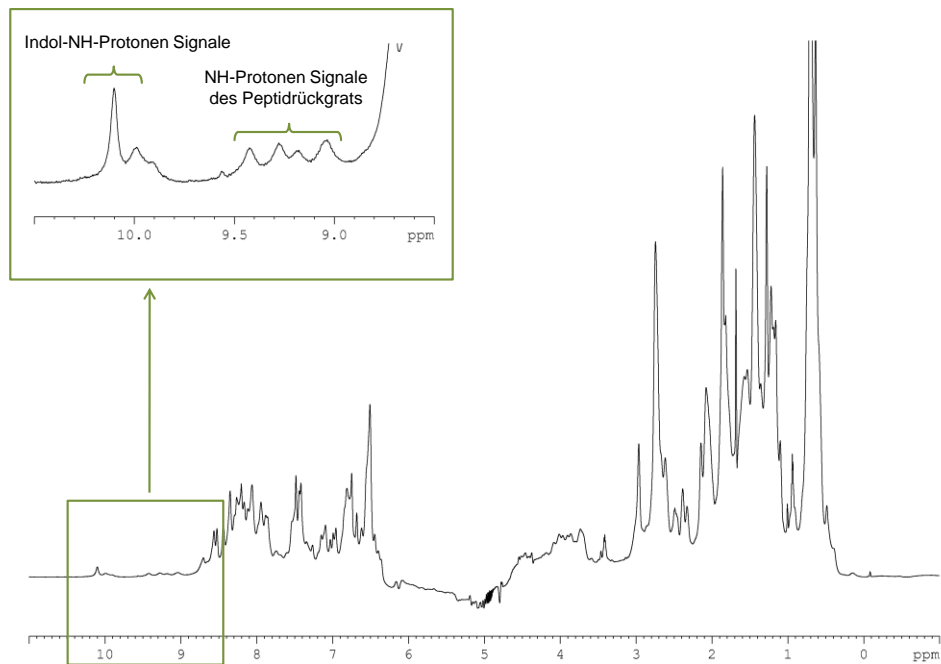


Abbildung 38. ^1H -NMR Spektrum des heteromeren [LZ1WW3+LZ3WW2]-Komplexes. Im Spektrum oben links sind die typischen chemischen Verschiebungen für gefaltete WW-Domänen zu erkennen.

3.6. Untersuchung des [LZ1WW3+LZ3WW2]-Komplexes mittels isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Während im Fern-UV CD-Spektrum ein Anstieg des α -helikalen Anteils im [LZ1WW3+LZ3WW2]-Peptidkomplex beobachtet wurde, was auf eine Assoziation beider Varianten zu einem heterooligomeren Coiled Coil-Komplex schließen lässt, sollten zusätzlich isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)-Experimente durchgeführt werden, um eine thermodynamische Beschreibung der Interaktion machen zu können.^[124] Mit deren Hilfe sollte die Heteroassoziation von LZ1WW3 (**6b**) mit LZ3WW2 (**7**) untersucht und entsprechende Bindungskonstanten ermittelt werden. Dabei wurde schrittweise eine konzentrierte Lösung von **7** in der Spritze zu einer Lösung von **6b** in der Probenzelle (bzw. **2** zu **1**) titriert und bei einer konstanten Temperatur von 25 °C gemessen. Jede Injektion führte zu einer Wärmeänderung in der Probe, aus der eine Änderung der Heizleistung resultierte, die gemessen wurde. Die Heteroassoziation des [LZ1WW3+LZ3WW2]-Komplexes ist in Abbildung 39 gezeigt. Zum Vergleich wurden analog ITC-Messungen für die isolierten LZ-Varianten LZ1 (**1**) und LZ3 (**2**) ohne die WW-Domänen durchgeführt. Die ITC-Experimente für die unmodifizierten LZ-Varianten [LZ1+LZ3] wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt (Material und Methoden Teil M3).

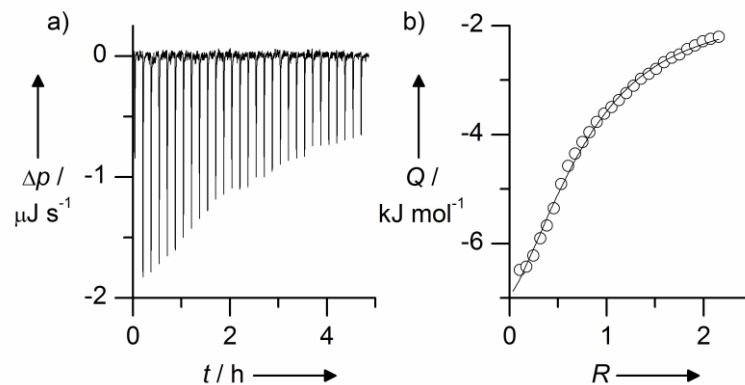


Abbildung 39. Heteroassoziation der Varianten LZ3WW2 (**7**) in LZ1WW3 (**6b**) untersucht durch isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) bei pH 7.0 und 25 °C. **a)** ITC-Rohdaten wurden durch Titration von jeweils 10 μL einer 1mM Lösung von **7** in eine 0.2 mM Lösung von **6b** erhalten. Die gemessene Heizleistung ist gegen die Zeit aufgetragen. **b)** Die beste Kurvenanpassung (durchgezogene Linie) an die normierten Reaktionswärmen, Q (Kreise), ergab eine Dissoziationskonstante von $K_D = 43 \mu\text{M}$. Dargestellt ist die Reaktionswärme in Abhängigkeit der zutitrierten Konzentration ($R = \text{molares Verhältnis von } 7 \text{ zu } 6b$).

Das Experiment zeigte einen exothermen Verlauf, wobei mit zunehmender LZ3WW2-Konzentration die gemessene Heizleistung abnahm, was auf die zunehmende Sättigung des Assoziationskomplexes zurückzuführen ist. Der [LZ1WW3+LZ3WW2]-Protein-Komplex wird durch enthalpische und entropische Beiträge stabilisiert und hat eine Dissoziationskonstante von $K_D = 43 \mu\text{M}$. Für den [LZ1+LZ3]-Coiled Coil Komplex der unmodifizierten Leucin-Zipper konnte eine Dissoziationskonstante von $K_D = 27 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Diesem Ergebnis zufolge haben die mittels NCL kovalent gebundenen WW-Domänen in den LZWW-Peptiden nur einen marginalen Effekt auf Coiled Coil vermittelte Protein-Protein-Interaktionen und die mittels CD-Spektroskopie erhaltenen Resultate werden somit bekräftigt. Umgekehrt konnte mit einem weiteren ITC-Experiment mit LZ3WW2 (7) und einem Polyprolinliganden (PPPLIPPPPPLPP)₂ gezeigt werden, dass die biologische Funktion der WW2-Domäne, welche die Erkennung prolinreicher Sequenzmotive in Zielproteinen umfasst, im LZ3WW2-Peptid (7) unwesentlich durch das Leucin-Zipper-Segment beeinträchtigt wurde (Daten sind im Material und Methoden Teil M3 dargestellt). Die Dissoziationskonstante zwischen 7 und dem Polyprolinliganden wurde als $K_D = 80 \mu\text{M}$ bestimmt, was gut mit den Werten für isolierte WW-Domänen übereinstimmt.^[82]

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine geeignete Strategie zur Synthese von bimodularen Peptiden mit definierten Sekundärstrukturen und Faltungseigenschaften entwickelt. Die als Oligomerisierungsmodule vorgesehenen α -helikalen Leucin-Zipper Varianten LZ1 und LZ3 konnten dabei erfolgreich mittels Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) synthetisiert und anschließend in C-terminale Peptidthioester transformiert werden. Die als funktionelle Module ausgewählten WW2- und WW3-Domänen des TCERG1-Proteins ließen sich gleichermaßen erfolgreich durch SPPS in Form N-terminaler Cysteinyl-Peptide unter Anwendung einer Fmoc-Strategie generieren. Anschließend wurden die verschiedenen LZ-Thioester und Cysteinyl-WW-Peptide baukastenartig durch native chemische Ligation (NCL) zu den jeweiligen LZWW-Peptiden verknüpft, wobei es im Falle des LZ1WW3 Ligationsprodukts der Entwicklung einer alternativen Ligationstrategie bedurfte.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die bimodular aufgebauten LZWW-Ligationspeptide mit Hilfe biophysikalischer Methoden hinsichtlich ihrer strukturellen Eigenschaften, wie Faltung, Stabilität und Bindungsverhalten analysiert. Durch CD- und NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur und Funktion der einzelnen Module in den jeweiligen LZWW-Peptiden erhalten bleiben. Während das LZ3WW2-Peptid sowohl von einer α -helikalen als auch einer β -Faltblatt-Struktur geprägt ist, konnte für das LZ1WW3-Peptid lediglich eine α -helikale Konformation bestimmt werden. Somit scheint das α -helikale LZ1-Segment keinen faltungsinduzierenden Effekt auf die ungefaltete WW3-Domäne im LZ1WW3-Konstrukt zu haben. Umgekehrt zeigte sich, dass die unstrukturierte WW3-Domäne die Stabilität des Leucin-Zippers nicht beeinflusst und demnach keine synergistischen Effekte im Gesamtpeptid auftreten. Das unabhängige Faltungsverhalten beider Ligationstrukturen konnte zudem durch zusätzliche pH- und Konzentrationsexperimente bestätigt werden. Die Erhaltung der biologischen Aktivität der WW2-Domäne im modularen Peptid wurde schließlich anhand von Bindungsexperimenten mit einem Polyprolin-Liganden nachgewiesen.

Durch die gerichtete Selbstassoziation der LZ-Segmente konnte abschließend auch die Bildung eines quarternären Coiled Coil Komplexes realisiert werden, was das große Potential dieses „Baukasten-Prinzips“ eindrucksvoll verdeutlicht.

In weiterführenden Arbeiten könnte der molekulare Baukasten um weitere Bausteine erweitert und beispielsweise zur Synthese von multifunktionalen Proteinkomplexen für die weitere Untersuchung und Manipulation von biologischen Systemen verwendet werden.

5. Material und Methoden

5.1. Chemikalien

Alle Lösungsmittel und Reagenzien wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Acetonitril	<i>Merck</i>	TFA(Trifluoressigsäure)	<i>Merck</i>
Acetanhydrid	<i>Merck</i>	TFE (Trifluorethanol)	<i>Sigma</i>
α -Cyano-4-Hydroxymzimsäure	<i>Fluka</i>		
Dichlormethan	<i>Merck</i>		
Diethylether	<i>J. T. Baker</i>		
Diisopropylcarbodiimid	<i>Fluka</i>		
Diisopropylethylamin	<i>Merck</i>		
Dinatriumhydrogenphosphat	<i>Fluka</i>		
<i>N, N</i> -Dimethylformamid	<i>Merck</i>		
Ethan-1,2-dithiol	<i>Merck</i>		
Guanidin Hydrochlorid	<i>Fluka</i>		
HOBt	<i>Fluka</i>		
Methylphenylsulfid	<i>Merck</i>		
Methyltertbutylether	<i>Merck</i>		
<i>N</i> -Methylmorpholin	<i>Merck</i>		
<i>N</i> -Methylpyrrolidon	<i>Fluka</i>		
<i>p</i> -Acetamidothiophenol	<i>ABCR Karlsruhe</i>		
Phenol	<i>Merck</i>		
Piperidin	<i>Merck</i>		
PyBOP	<i>Novabiochem</i>		
TCEP	<i>Fluka</i>		

5.1.1. Geschützte Aminosäure-Derivate und Harze für die Peptidsynthese

Boc-Ala-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Ala-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Ala-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH	<i>Novabiochem, Jupiter Bioscience</i>
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Asn(Trt)-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Cys(Trt)-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Gln(Trt)-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Glu(OtBu)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH	<i>Novabiochem, Jupiter Bioscience</i>
Fmoc-Gly-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Leu-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Leu-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH	<i>Novabiochem, Jupiter Bioscience</i>
Fmoc-Ileu-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Lys(Boc)-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH	<i>Novabiochem, Jupiter Bioscience</i>
Fmoc-Phe-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Pro-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Ser(tBu)-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Thr(tBu)-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Trp(Boc)-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Trp(Boc)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH	<i>Novabiochem, Jupiter Bioscience</i>
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	<i>Novabiochem</i>
Fmoc-Val-OH	<i>Novabiochem</i>
TentaGel S Trt-Ala Fmoc (0.25 mmol/g)	<i>Rapp Polymere</i>
TentaGel S Trt-Trp(Boc)Fmoc (0.22 mmol/g)	<i>Rapp Polymere</i>
TentaGel S Ram (0.24 mmol/g)	<i>Rapp Polymere</i>

5.2. Chemische Methoden

5.2.1. Automatisierte Festphasen-Peptidsynthese

Alle automatisierten Peptidsynthesen wurden in dieser Arbeit nach der Fmoc-Strategie^[92] unter Verwendung eines Syntheseautomaten (MultiPep RS, Intavis) durchgeführt. Zudem wurden alle Peptidsynthesen im 0.05 mmol Maßstab an TentaGel Harzen bei Raumtemperatur und an der Luft durchgeführt. Für C-terminale Peptidsäuren wurden TentaGel S Trt Harze (Beladung 0.22 - 0.25 mmol/g) und für Peptidamide TentaGel S Ram Harze (Beladung 0.24 mmol/g) eingesetzt. Dabei wurden alle Peptide ausgehend vom C-Terminus synthetisiert. Hierfür wurden N-Terminale geschützte Fmoc-Aminosäuren, ebenso nicht-proteinogene Aminosäuren (Pseudoproline), verwendet und in Gegenwart von PyBOP und NMM in DMF bzw. NMP gekuppelt. Folgende Aminosäuren wurden in NMP gelöst: Arg, His, Phe, Pro und alle Pseudoproline. Die Konzentration der in DMF bzw. NMP gelösten Edukte betrug somit für die Fmoc-AS 0.67 M, für PyBOP 0.95 M und für NMM 4 M. Alle Synthesen wurden in Polypropylenspritzen (20 mL) mit integrierten Kunststoffritten durchgeführt. Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgte in 20% Piperidin/DMF.

Die Syntheseschritte sind wie folgt aufgeführt:

1. Fmoc-Abspaltung

900 μL einer 20%-igen Piperidin Lösung in DMF (v/v) wurden zu dem Harz pipettiert. Nach 5 Minuten wurde das Lösungsmittel für 30 s abgesaugt und erneut 20%-ige Piperidin Lösung auf das Harz pipettiert (8 min).

2. Waschen

DMF wurde in die Spritzen pipettiert und das Harz für 10 s geschüttelt und 1 min stehen gelassen, bevor das Lösungsmittel in 20 s abgesaugt wurde. Dieser Waschzyklus wurde weitere sechsmal wiederholt (2 x 8500 μL , 5 x 7200 μL).

3. Aminosäurekupplung

Nacheinander wurden die jeweiligen Fmoc-Aminosäuren in DMF bzw. NMP mit PyBOP und NMM in einem Mixreservoir aktiviert und zum Harz pipettiert. Über eine Reaktionszeit von 20 min wurde das Harz im Abstand von 4 min für die Dauer

von 20 s geschüttelt. Anschließend wurde die Reagenzlösung für 30 s abgesaugt und der Kupplungszyklus wiederholt (Doppelkupplung).

4. Waschen

DMF wurde in die Spritzen pipettiert und das Harz für 10 s geschüttelt und 1 min stehen gelassen, bevor das Lösungsmittel in 20 s abgesaugt wurde. Dieser Waschzyklus wurde weitere sechsmal wiederholt (2 x 8500 μ L, 5 x 7200 μ L).

5. Wiederholungen

Für die Zyklen 1-10 wurden die Schritte 1.-4. wiederholt. Die Reaktionszeiten der darauffolgenden Zyklen 11-31 wurden auf 30 min erhöht und ab Zyklus 32 wurden Dreifachkupplungen mit Reaktionszeiten von jeweils 40 min eingestellt.

6. Finale

Am Ende des Sequenzaufbaus wurden die Harze mit 20% Piperidin in DMF geschüttelt (1 x 8 min, 1 x 15 min und 1 x 20 min) und abschließend mit DMF (1 x 9600 μ L, 2 x 7200 μ L, 5 x 8500 μ L), Ethanol (4 x 2400 μ L) und Dichlormethan (3 x 1000 μ L) gewaschen.

5.2.2. Manuelle Aminosäurekupplung

Für die Synthese der Peptidthioester wurde nach der automatisierten Festphasensynthese der freie N-Terminus mit einer Boc-Aminosäure orthogonal geschützt. Hierfür wurde das Harz mit einer Lösung von Boc-Ala-OH im 5-fachen Überschuss, HOBt (1 Äquiv.) und DIC (1 Äquiv.) in DMF versetzt und 2.5 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktionslösung entfernt und die Kupplung unter denselben Bedingungen wiederholt (Doppelkupplung).

5.2.3. Probeabspaltungen

Probeabspaltungen wurden durchgeführt, um die Vollständigkeit von Kupplungen mittels HPLC- und Massenanalyse zu verfolgen. Hierfür wurden geringe Harzmengen abgenommen und mit einer Lösung aus TFA (10 mL), Phenol (0.75 g), Wasser (0.5 mL), Methylphenylsulfid (0.5 mL) und Ethan-1,2-dithiol (0.25 mL) für 3 - 4 h behandelt und anschließend in MTBE gefällt, zentrifugiert und dreimal mit Diethylether gewaschen.

5.2.4. Abspaltung der Peptide vom Harz unter Erhalt der Seitenschutzgruppen

Wenn die Seitenschutzgruppen bzw. N-terminalen Boc-Schutzgruppen an den entsprechenden Aminosäuren verbleiben sollten, erfolgte die Abspaltung des Peptids vom Harz in einer Lösung aus DCM/TFE/AcOH (3:1:1) bei RT (1 x 2 h und 1 x 1 h). Anschließend wurden die vom Harz abgetrennten Abspalllösungen vereint, mit *n*-Hexan dreimal kodestilliert und der Rückstand zweimal aus Dioxan lyophilisiert.

5.2.5. TFA Abspaltung der Seitenschutzgruppen/ Peptide vom Harz

Die Abspaltung der Seitenschutzgruppen der Peptide, sowie die gleichzeitige Abspaltung vom Harz erfolgte in einer Lösung aus TFA (10 mL), Phenol (0.75 g), Wasser (0.5 mL), Methylphenylsulfid (0.5 mL) und Ethan-1,2-dithiol (0.25 mL) für drei bis vier Stunden bei Raumtemperatur (RT). Bei diesem Vorgang wurden die Pseudoproline ebenfalls gespalten. Die Abspalllösungen wurden vom Harz filtriert und die Peptide in MTBE bei -20 °C ausgefällt und anschließend bei 3500 rpm (Umdrehungen pro Minute) abzentrifugiert. Der Peptidrückstand wurde mit Diethylether bei RT gewaschen und ebenfalls abzentrifugiert (3 x 1 min bei 3500 rpm und 1 x 5 min bei 4000 rpm). Schließlich wurden die Peptide gereinigt und lyophilisiert. Je nach Auswahl des Harzes lagen die Peptide als C-terminales Amid (S RAM Harz) oder C-terminale Säure (Trityl-Harz) vor.

5.2.6. Synthese der isolierten Leucin-Zipper Peptide

- 1 $\text{H}_2\text{N-ARMKQLEDKVEELLSKNYHLENEKARLEKLVA-CONH}_2$ ($M = 3825.3 \text{ g/mol}$)
 2 $\text{H}_2\text{N-ARMKQLEDKVEELLSKIYHNENEVARLKKLVA-CONH}_2$ ($M = 3795.4 \text{ g/mol}$)

Die Synthesen der isolierten Leucin-Zipper-Peptide (1) und (2) wurden im 0.05 mmol Maßstab nach der Fmoc-Strategie unter Verwendung eines Syntheseautomaten (MultiPep RS, Intavis) an TentGel-S RAM Harzen (208 mg, Beladung 0.24 mmol/g) durchgeführt. Nach Abspaltung der Peptide vom Harz mit TFA, wurden die vollständig entschützten Peptidamide mittels RP-HPLC gereinigt und lyophilisiert. Die Ausbeute nach Reinigung betrug für (1) 26% (49 mg, 12.8 μmol) und für (2) 22% (41 mg, 10.8 μmol) bezogen auf den Synthesemaßstab (0.05 mmol).

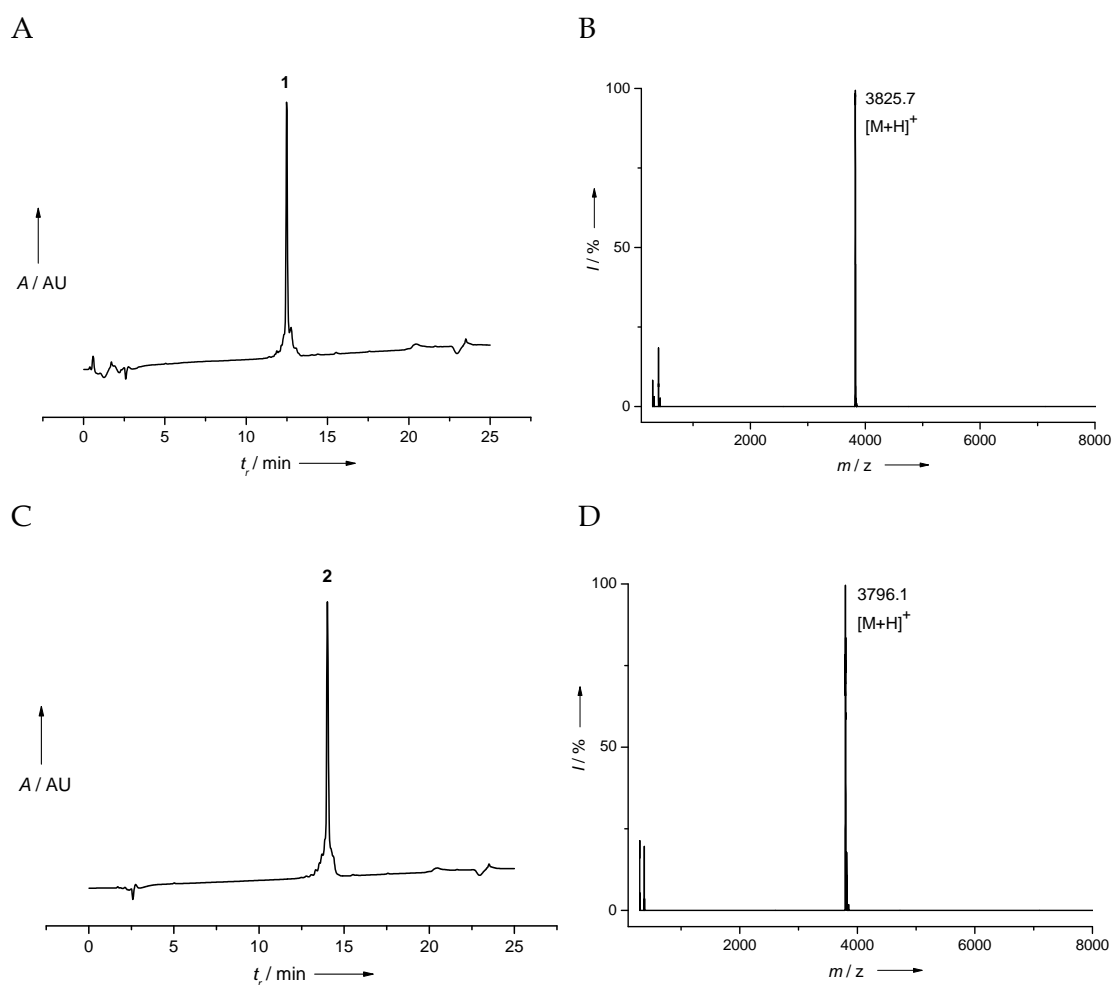


Abbildung M1. HPLC-Chromatogramm und MALDI-ToF Spektrum der Leucin-Zipper-Peptide (1) und (2). **A.** HPLC-Profil von 1 bei einer Retentionszeit $t_r = 12.5$ min; **B.** MALDI-ToF von 1 $m/z = 3825.7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; **C.** HPLC-Profil von 2 bei einer Retentionszeit $t_r = 14.0$ min; **D.** MALDI-ToF von 2 $m/z = 3796.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5.2.7. Synthese der WW-Peptide

3* H₂N-AVSEWTEYKTIANGKTYYYNNRTLESTWEKPQ-CONH₂ (M = 3758.0 g/mol)

4* H₂N-VAIAPIGTPWCVVWIGDERVFFYNPTTRLSMWDR-CONH₂ (M = 4069.6 g/mol)

Die Synthesen der WW-Peptide (**3***) und (**4***) wurden ebenfalls nach der Fmoc-Strategie im 0.05 mmol Maßstab an Tentagel-S RAM Harzen (208 mg, Beladung 0.24 mmol/g) durchgeführt. Im Hinblick auf die CD-Messungen wurden die WW-Peptide (**3**) und (**4**) ohne die N-terminale „CGG“-Sequenz synthetisiert (vgl. S. 45, Tabelle 4). Nach Beendigung der Synthese wurden die Peptide mit einer TFA-Lösung vom Harz abgespalten und gereinigt. Die Ausbeute nach Reinigung mittels RP-HPLC betrug für (**3***) 22% (42 mg, 11.2 µmol) und für (**4***) 19% (38 mg, 9.3 µmol) bezogen auf den Synthesemaßstab (0.05 mmol).

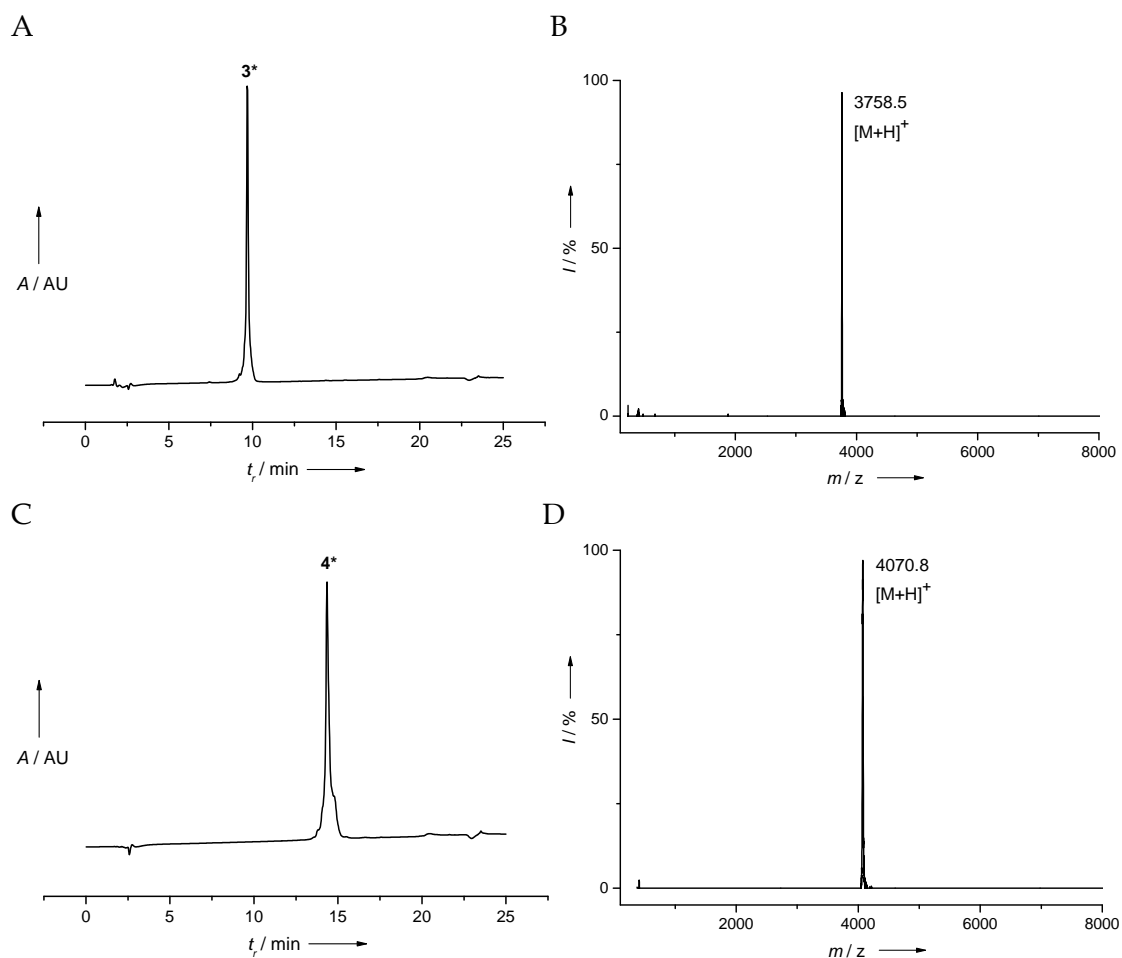


Abbildung M2. HPLC-Chromatogramm und MALDI-ToF Spektrum der WW-Peptide (**3***) und (**4***). **A.** HPLC-Profil von **3*** bei einer Retentionszeit $t_r = 9.7$ min; **B.** MALDI-ToF von **3*** $m/z = 3758.5$ [M+H]⁺; **C.** HPLC-Profil von **4*** bei einer Retentionszeit $t_r = 14.4$ min; **D.** MALDI-ToF von **4*** $m/z = 4070.8$ [M+H]⁺.

Die detaillierten Synthesen der für die Ligation verwendeten WW-Peptide (**3**), (**4b**) und (**5**) wurden bereits im Ergebnis-Teil gezeigt und die Ergebnisse sind an dieser Stelle nochmals zusammengefasst.

- 3** H₂N-CGGAVSEWTEYKTANGKTYYYNNRTLESTWEKPQ-CONH₂
40 mg (10.1 μmol, 20 %), weißer Feststoff, Retentionszeit t_r = 9.8 min
MALDI-MS: berechnet: 3975.3 gefunden: 3975.5
- 4b** H₂N-CVVWIGDERVFFYNPTTRLSMWDR-CONH₂
23 mg (7.7 μmol, 15 %), weißer Feststoff, Retentionszeit t_r = 12.9 min
MALDI-MS: berechnet: 2978.4 gefunden: 2979.3
- 5** H₂N-CGGVATAPIGTPWCVVWIGDERVFFYNPT-CONH₂
22 mg (6.8 μmol, 14 %), weißer Feststoff, Retentionszeit t_r = 14.3 min
MALDI-MS: berechnet: 3240.7 gefunden: 3241.2

5.2.8. Allgemeines Protokoll für die Synthese der C-terminalen α -Thioester Peptide

Die Peptidthioester (**1a**) und (**2a**) wurden an einem Fmoc-Ala-Trityl Harz (Beladung 0.25 mmol/g, 200 mg) und **1b** am Fmoc-Trp-Trityl Harz (Beladung 0.22 mmol/g, 227 mg) am Peptidautomaten synthetisiert. Anschließend wurden die Peptide mit Essigsäure und Trifluorethanol in DCM vom Harz abgespalten (1:1:3, v/v/v), mit *n*-Hexan kodestilliert (3x) und zweimal aus Dioxan lyophilisiert. Die N-terminal- und Seitenkettengeschützten Rohpeptide wurden mit *p*-Acetamidothiophenol ($M = 167.23$ g/mol, 15 Äquiv.), HOBt (katalyt. Mengen) und DIC (2 Äquiv.) in wasserfreiem DCM versetzt, mit N_2 -Gas gespült und über Nacht bei RT unter N_2 -Atmosphäre gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und die Peptide wurden mit einer Lösung aus TFA (10 mL), Phenol (0.75 g), Wasser (0.5 mL), Methylphenylsulfid (0.5 mL) und Ethan-1,2-dithiol (0.25 mL) für drei bis vier Stunden bei RT komplett entschützt. Im Anschluss wurden die Peptide in MTBE gefällt, abzentrifugiert und dreimal mit Diethylether getrocknet. Nach anschließender Reinigung mittels präparativer HPLC und Charakterisierung (analytische HPLC, MALDI-ToF) wurden die Peptidthioester aus $H_2O/MeCN$ lyophilisiert.

1a H_2N -ARMKQLEDKVEELLSK $\overline{NYHLENEKARLEKLVA}$ -COSR2

($R_2 \triangleq C_7H_8NO \triangleq p$ -Aatp)

38 mg (9.6 μ mol, 19 %), weißer Feststoff, Retentionszeit $t_r = 13.9$ min

MALDI-MS: berechnet: 3975.6 gefunden: 3975.2

1b H_2N -ARMKQLEDKVEELLSK $\overline{NYHLENEKARLEKLVGGVATAPIPGTPW}$ -COSR2

($R_2 \triangleq C_7H_8NO \triangleq p$ -Aatp))

39 mg (7.6 μ mol, 15 %), weißer Feststoff, Retentionszeit $t_r = 14.1$ min

MALDI-MS: berechnet: 5109.9 gefunden: 5109.6

2a H_2N -ARMKQLEDKVEELLSKIYHNENEVARLKKLVA-COSR2

($R_2 \triangleq C_7H_8NO \triangleq p$ -Aatp)

32 mg (8.1 μ mol, 16%), weißer Feststoff, Retentionszeit $t_r = 14.9$ min

MALDI-MS: berechnet: 3945.6 gefunden: 3945.8 und 1972.9

5.2.9. Allgemeines Protokoll für die native chemische Ligation

Die native chemische Ligation wurde im wässrigen Puffer durchgeführt. Hierfür wurden 6 M GdnHCl, 200 mM Na₂HPO₄ und 20 mM tris-(2-carboxyethyl)-phosphine (TCEP) in Wasser gelöst und der pH-Wert zwischen 6.8-7.0 eingestellt. Die zu verknüpfenden Peptide wurden in dem Ligationspuffer mit einer Konzentration von 1.25 mM gelöst und die Reaktionslösung anschließend mit N₂-Gas gespült und bei RT gerührt. Mittels analytischer RP-HPLC wurde die Reaktion überwacht und durch Zugabe von TFA beendet. Im Anschluss wurde das Ligationsprodukt mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

- 7** H₂N-ARMKQLEDKVEELLSKIYHNENEVARLKKLVA-
CGGAVSEWTEYKTANGKTYYYNNRTLESTWEKPQ-CONH₂
- 26 mg (3.4 μmol, 34 %), weißer Feststoff, Retentionszeit t_r = 13.9 min
MALDI-MS: berechnet: 7753.6 gefunden: 7754.3
- Eingesetzten Edukte: **2a** 40 mg, 10.1 μmol
3 44 mg, 11.1 μmol
- 6b** H₂N-ARMKQLEDKVEELLSKNYHLENEKARLEKLV-
GGVATAPIGTPWCVVWTGDERVFFYNPTTRLSMWDR-CONH₂
- 17 mg (2.2 μmol, 28 %), weißer Feststoff, Retentionszeit t_r = 14.4 min
MALDI-MS: berechnet: 7921.0 gefunden: 7921.9
- Eingesetzten Edukte: **1b** 39 mg, 7.6 μmol
4b 25 mg, 8.4 μmol

5.3. Analytische und biophysikalische Methoden

5.3.1. Reinigung und Charakterisierung der Peptide – Chromatographische Methoden

Die Analyse und Aufreinigung der Rohpeptide wurde über Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) an *Waters* Systemen (*Waters*, Eschborn, Deutschland) in analytischem bzw. präparativem Maßstab bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Säulen dienten C-18 Polyencap Säulen der Firma *Vydac* mit einem Eluentensystem aus zwei Lösungsmitteln (Lösungsmittel A : Wasser mit 0.05% TFA; Lösungsmittel B : Acetonitril mit 0.05% TFA).

Die Trennung im *präparativen Maßstab* erfolgte unter Verwendung einer *Vydac TP C18* Säule (250mm, ID 22 mm, PolyEncap 300 A, 15-20 μm ; Bischoff Analysentechnik GmbH, Leonberg, Deutschland) über einen linearen Gradienten von 5-60 % Eluent B über 30 Minuten mit einer Flußrate von 20 mL/min. Die UV-Detektion wurde bei 214 nm durchgeführt. Es wurden ca. 60-80 mg Peptid in 10 - 20 mL Wasser bzw. Wasser-/Acetonitrilgemisch gelöst. Alle gereinigten Peptide wurden anschließend lyophilisiert.

Die Trennung im *analytischen Maßstab* erfolgte unter Verwendung einer *Vydac C18* Säule über einen linearen Gradienten von 5-60 % Eluent B über 30 Minuten mit einer Flußrate von 1.2 mL/min. Dabei wurde eine Peptidlösung von 1 mg/ml hergestellt und davon 20 μL injiziert. Die UV-Detektion erfolgte analog zur präparativen Trennung ebenfalls bei einer Wellenlänge von 214 nm. Die gereinigten Peptide lagen nach Synthese und Reinigung mit Trifluoracetat als Gegenion vor.

5.3.2. Massenspektrometrie

Die Identifizierung der synthetisierten Peptide erfolgte mittels Massenspektrometrie. MS-Spektren wurden an einem MALDI-ToF-Instrument (*Voyager-LT*, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) ausgestattet mit einem Nd:YAG-Laser (337 nm) bei einer Frequenz von 200 Hz aufgenommen. Es wurde jeweils 1 μL der Probenlösung mit 1 μL der Matrixlösung (α -Cyano-4-Hydroxycinnam-säure in MeCN/Wasser, 2/1 (v/v)) auf die Proben-Platte aufgetragen und an der Luft bei RT getrocknet.

Die angegebenen Werte sind m/z-Daten. Die Massen (*average*) der Peptide wurden mit den Programmen *ProtParam tool* <http://kr.expasy.org/tools/protparam.html> und *Ionsource Peptide Mass Calculator* <http://www.ionsource.com/programs/pepcalc.htm> berechnet und sind in [g/mol] angegeben.

5.3.3. CD-Messungen

Die CD-Spektroskopie wurde genutzt, um Faltungszustände und Schmelzpunkte der Peptide zu bestimmen. Alle CD-Spektren wurden an einem Jasco J-720 Spektrometer (*Jasco Corp.*, Hachioji, Japan) mit einem PTC-348WI Pelletier Temperaturregler (*Jasco*) bei einem konstanten N₂-Strom aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei verschiedenen Peptidkonzentrationen zwischen 10 µM und 50 µM in 0.1 cm Quarzküvetten mit einem Probenvolumen von 200 µL. Die Peptide wurden in Phosphatpuffer (wässrige Lösung 154 mM NaF, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.0) oder Millipore-Wasser gelöst. Für die pH-Untersuchungen wurden die Peptide in Phosphatpuffer mit dem gewünschten pH-Wert gelöst. Jeweilige Konzentrationen, Temperaturen und pH-Werte zu den aufgenommenen Messungen sind bei den entsprechenden CD-Spektren angegeben. Für die Auswertung der CD-Spektren wurde der Puffer in derselben Küvette unter identischen Bedingungen vermessen und das resultierende CD-Spektrum vom Probenspektrum subtrahiert. Für die Darstellung der CD-Spektren wurde die Absorptionsdifferenz ΔA für links und rechts zirkular polarisiertes Licht gemessen und in die gemessene Elliptizität Ψ umgerechnet. Die CD-Signale werden in mittlerer molarer Elliptizität (also: pro Aminosäurerest) angegeben und in Abhängigkeit der Wellenlänge λ aufgezeichnet. Zur Berechnung der mittleren molaren Elliptizität pro Rest [θ] wurden folgende Gleichungen verwendet:

$$\text{a) } [\theta]_m = \frac{\Psi}{c \times d} \quad \text{b) } [\theta] = \frac{[\theta]_m}{n}$$

[θ]_m = molare Elliptizität [grad cm² · dmol⁻¹]

d = Schichtdicke [cm]

[θ] = mittlere molare Elliptizität [grad cm² · dmol⁻¹]

c = Konzentration [mol l⁻¹]

Ψ = gemessene Elliptizität [grad]

n = Anzahl der Aminosäurereste

Die gemessenen CD-Rohdaten wurden mit Hilfe der von Prof. Dr. Sandro Keller (FMP Berlin) zur Verfügung gestellten „CD-Deconvolution“-Software in die mittleren molaren Elliptizitäten $[\theta]$ in $[\text{k grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}]$ umgerechnet ($k = \text{kilo}$).

CD-Spektren und die thermische Denaturierung wurden an demselben Gerät durchgeführt. Die Bedingungen waren wie folgt:

CD-Spektren		Thermische Denaturierung	
Wellenlängenbereich	260 - 190 nm	Wellenlänge	230 nm
Datenabstand	0.1 nm	Auflösung	0.1 °C
Scan-Modus	kontinuierlich	Heizrate	60 °C/h
Abtastgeschwindigkeit	50 nm/min	Temperatur	10 - 94 °C
Empfindlichkeit	50 mdeg	Empfindlichkeit	50 mdeg
Bandbreite	1 nm	Bandbreite	1 nm
Antwortzeit	2 s	Antwortzeit	4 s
Akkumulationen	5		

5.3.4. NMR-Messungen

Die $1\text{D-}^1\text{H}$ NMR Spektren wurden von Dr. Peter Schmieder am FMP Berlin aufgenommen. Die Proben wurden in Puffer (154 mM NaF, 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0) bzw. Millipore-Wasser bei einer Peptidkonzentration von 30-40 μM gemessen. Alle Messungen wurden entweder auf dem *Bruker DRX600*, *Bruker DMX750* oder *Bruker AV900* NMR Spektrometer bei einer Temperatur von 279 K durchgeführt.

5.3.5. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)-Messungen

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten der modular synthetisierten LZWW-Peptide und die Untersuchung einer möglichen Bindung der WW2-Domäne im LZ3WW2 (7) an einen Polyprolin-Liganden wurde in der Gruppe von Prof. Dr. Sandro Keller ein "VP-ITC MicroCalorimeter" (Microcal Inc., USA) genutzt. Die Konzentrationen der Lösungen in der Meßzelle (Analyt) betragen 100 μM bzw. 200 μM bei einem Volumen von 1.2 mL und die Konzentration der in der Spritze (Titrant) vorgelegten Lösungen betrug 1 mM bei einem Volumen von 500 μL . Es wurden schrittweise 10 μL Lösungsvolumina in die Meßzelle titriert (30 Injektionen). Die Zelltemperatur betrug 25 °C und die Rührgeschwindigkeit 307 rpm (*revolutions per minute*-Umdrehungen pro Minute).

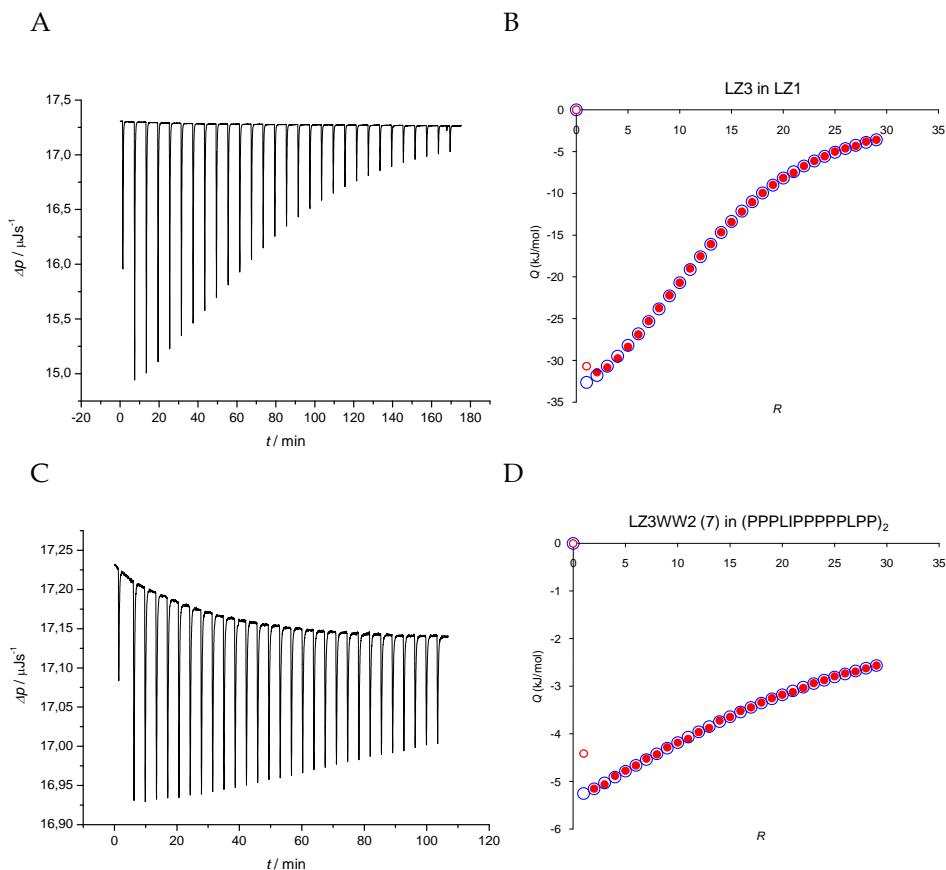


Abbildung M3. ITC-Experimente bei pH 7.0 und 25 °C. **A.** ITC-Rohdaten der Variante LZ3 (2) in LZ1 (1). **C.** ITC-Rohdaten von LZ3WW2 (7) in (PPPLIPPPPLPP)₂. Die gemessene Heizleistung ist gegen die Zeit aufgetragen. **B.** und **D.** Die beste Kurvenanpassung an die integrierten Rohdaten (rot) ist durch die blauen Kreise dargestellt. Dargestellt ist die Reaktionswärme in Abhängigkeit der zutitrierten Konzentration (R = molares Verhältnis).

6. Literaturverzeichnis

- [1] Takuyi Yamada & Peer Bork, Evolution of biomolecular networks-lessons from metabolic and protein interactions, *Nature Reviews* **2009**, 10, 791-803.
- [2] S. Maslov & K. Sneppen, Specificity and stability in topology of protein networks, *Science* **2002**, 296, 910-913.
- [3] T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*. W. H. Freeman and Company: New York, **1996**.
- [4] T. Pawson, Protein modules and signalling networks, *Nature* **1995**, 373, 573-580.
- [5] E. Ravasz, A. L. Somera, D. A. Mongru, Z. N. Oltvai & A. L. Barabási, Hierarchical organization of modularity in metabolic networks, *Science* **2002**, 297, 1551-1555.
- [6] V. Spirin & L. A. Mirny, Protein complexes and functional modules in molecular networks, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 12123-12128.
- [7] J. D. Han, Evidence for dynamically organized modularity in the yeast protein-protein interaction network, *Nature* **2004**, 430, 88-93.
- [8] L. Holm & C. Sander, Dictionary of recurrent domains in *protein* structures. *Proteins* **1998**, 33, 88-96.
- [9] R. Breinbauer, I. R. Vetter & H. Waldmann, Von Proteindomänen zu Wirkstoffkandidaten-Naturstoffe als Leitkulturen für das Design und die Synthese von Substanzbibliotheken, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 3002-3015.
- [10] M. Weir, M. Swindells & J. Overington, Insights into protein function through large-scale computational analysis of sequence and structure, *Trends Biotechnol.* **2001**, 19, 61-66.
- [11] C. P. Ponting, J. Schultz, R. P. Copley, M. A. Andrade & P. Bork, Evolution of domain families, *Adv. Protein. Chem.* **2000**, 54, 185-244.
- [12] S. Das & T. F. Smith, Identifying nature's protein lego set, *Adv. Prot. Chem.* **2000**, 54, 159-183.
- [13] W.H. Landschulz, P. F. Johnson & S. L. Mc Knight, The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **1988**, 240, 1759-1764.

- [14] K. M. Arndt, K. M. Müller & A. Plückthun, Helix-stabilized Fv (hsFv) antibody fragments: substituting the constant domains of a Fab fragment for a heterodimeric coiled-coil domain. *J. Mol. Biol.* **2001**, 312, 221-228.
- [15] J. N. Pelletier, F. X. Campbell-Valois & S. W. Michnick, Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 12141-12146.
- [16] a) E. H. C. Bromley, K. Channon, E. Moutevelis & D. Woolfson, Peptide and protein building blocks for synthetic biology: From programming biomolecules to self-organized biomolecular systems, *ACS Chem Biol.* **2008**, 3, 38-50.
- b) S. Zhang, Fabrication of novel biomaterial through molecular self-assembly, *Nature Biotech.* **2003**, 21, 1171-1178.
- c) H. R. Marsden & A. Kros, Selbstorganisation von Coiled-Coils in der synthetischen Biologie: Inspiration und Fortschritt, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 3050-3068.
- [17] P. Jiang, L. Ko, K.R. Jansen, T. E. Golde & S. Yen, Using leucine zipper to facilitate α -synuclein assembly, *FASEB* **2008**, 22, 1-10.
- [18] F. Zhang, K. A. Timm, K. M. Arndt & G. A. Woolley, Photocontrol of Coiled-Coil Proteins in Living Cells, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 4035-4038.
- [19] R. B. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
- [20] R. B. Merrifield, Solid Phase Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, 97, 799-810.
- [21] W. C. Chan & P. D. White, Fmoc solid phase peptide synthesis – a practical approach, Oxford University Press, New York, **2000**.
- [22] D. R. Englebretsen, B. C. Garnham, D. A. Bergman & P. F. Alewood, A novel thioether linker: Chemical synthesis of a HIV-1 protease analogue by thioether ligation, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 8871-8874.
- [23] M. Baca, T. W. Muir, M. Schnölzer & S. B. H. Kent, Chemical ligation of cysteine containing peptides: synthesis of a 22 kDa tethered dimer of HIV-1 protease. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 1881-1887.
- [24] T. Kimmerlin & D. Seebach, '100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies, *J. Peptide Res.* **2005**, 65, 229-260.

- [25] B. L. Nilsson, M. B. Soellner & R. T. Raines, Chemical synthesis of proteins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, 34, 91-118.
- [26] C. Hackenberger & D. Schwarzer, Chemoselective ligation and modification strategies for peptides and proteins, *Angew.Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 10030-10074.
- [27] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang & H. Lau, Bildung von S-haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten. *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, 583, 129-149.
- [28] D. S. Kemp, S. L. Leung & D. J. Kerkman, Models that demonstrate peptide bond formation by prior thiol capture. I. Capture by disulfide formation, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 181-184.
- [29] M. Schnölzer & S. B. H. Kent, Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV Protease, *Science* **1992**, 256, 221-225.
- [30] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis & S. B. H. Kent, Synthesis of proteins by native chemical ligation, *Science* **1994**, 266, 776-779.
- [31] T. W. Muir, D. Sondhi & P. A. Cole, Expressed protein ligation: a general method for protein engineering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6705-6710.
- [32] T. W. Muir, Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 249-289.
- [33] T. M. Hackeng, J. H. Griffin & P. E. Dawson, Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 10068-10073.
- [34] P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghadiri & S. B. H. Kent, Modulation of reactivity in native chemical ligation through the use of thiol additives, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119 (19), 4325-4329.
- [35] E. C. B. Johnson & S. B. H. Kent, Insights into the mechanism and catalysis of the native chemical ligation reaction, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6640-6646.
- [36] D. Macmillan, Evolving strategies for protein synthesis converge on native chemical ligation, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7668-7672.
- [37] J. P. Tam, Y. Lu, C. Liu & J. Shao, Peptide synthesis using unprotected peptides through orthogonal coupling methods, *Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 12485-12489.

- [38] A. B. Clippingdale, C. J. Barrow & J. D. Wade, Peptide thioester preparation by Fmoc solid phase peptide synthesis for use in native chemical ligation, *J. Pept. Sci.* **2000**, 6, 225–234.
- [39] J. A. Camarero, B. J. Hackel, J. J. de Yoreo & A. R. Mitchell, Fmoc-based synthesis of peptide α -thioesters using an aryl hydrazine support, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4145–4151.
- [40] J. A. Camarero & A. R. Mitchell, Synthesis of proteins by native chemical ligation using Fmoc-based chemistry, *Protein Pept. Lett.* **2005**, 12, 723–728.
- [41] B. J. Backes & J. A. Ellman, Carbon-carbon bond-forming methods on solid support. Utilization of Kenners 'safety-catch' linker, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11171–11172.
- [42] B. J. Backes, A. V. Virgilio & J. A. Ellman, Activation method to prepare a highly reactive acylsulfonamide 'safety-catch' linker for solidphase synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3055–3056.
- [43] R. Ingenito, E. Bianchi, D. Fattori & A. Pessi, Solid phase synthesis of peptide C-terminal thioesters by Fmoc/*t*-Bu chemistry, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11369–11374.
- [44] B. J. Backes & J. A. Ellman, An alkanesulfonamide "safety-satch" linker for solid-phase synthesis, *Org. Chem.* **1999**, 64 (7), 2322–2330.
- [45] R. von Eggelkraut-Gottanka, A. Klose, A. G. Beck-Sickinger & M. Beyermann, Peptide α -thioester formation using standard Fmoc-chemistry, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 3551–3554.
- [46] F. H. S. Crick, The Fourier transform of a coiled-coil, *Acta Crystallogr.* **1953**, 6, 685–689.
- [47] A. N. Lupas & M. Gruber, The structure of alpha-helical coiled coils, *Adv. Protein Chem.* **2005**, 70, 37–78.
- [48] D. N. Woolfson, The design of coiled-coil structures and assemblies, *Adv. Protein Chem.* **2005**, 70, 79–112.
- [49] E. K. O'Shea, K. J. Lumb & P. S. Kim, Peptide 'Velcro': design of a heterodimeric coiled coil, *Curr. Biol.* **1993**, 3, 658–667.
- [50] J. Mason & K. Arndt, Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications, *ChemBioChem* **2004**, 5, 170–176.

- [51] W. D. Kohn, C. M. Kay & R. S. Hodges, Protein destabilization by electrostatic repulsions in the two-stranded α -helical coiled-coil/leucine zipper, *Protein Sci.* **1995**, 4237-250.
- [52] A. Rose & I. Meier, Scaffolds, levers, rods and springs: diverse cellular functions of long coiled-coil proteins, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, 61, 1996-2009.
- [53] W. Shu, J. Liu, H. Ji & M. Lu, Core structure of the outer membrane lipoprotein from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **2000**, 299, 1101-1112.
- [54] R. C. Lin & R. H. Scheller, Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2000**, 16, 19-49.
- [55] R. D. Vale & R. A. Milligan, The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins, *Science* **2000**, 288, 88-95.
- [56] P. Jiang, L. Ko, K. R. Jansen, T. E. Golde & S. Yen, Using leucine zipper to facilitate α -synuclein assembly, *FASEB J.* **2008**, 22, 3165-3174.
- [57] F. Boato, R. M. Thomas, A. Ghasparian, A. Freund-Renard, K. Moehle & J. A. Robinson, Synthetic virus-like particles from self-assembling coiled-coil lipopeptides and their use in antigen display to the immune system, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 9015-9018.
- [58] A. G. Hinnebusch & K. Natarajan, Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress, *Eukaryot. Cell* **2002**, 1, 22-32.
- [59] E. K. O'Shea, J. D. Klemm, P. S. Kim & T. Alber, X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil, *Science* **1991**, 254, 539-544.
- [60] F. H. S. Crick, The packing of α -helices: simple coiled coils, *Acta Crystallogr.* **1953**, 6, 689-698.
- [61] P. B. Harbury, T. Zhang, P. S. Kim & T. Alber, A switch between two-, three, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants, *Science* **1993**, 262, 1407-1407.
- [62] E. K. O'Shea, R. Rutkowski & P. S. Kim, Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun, *Science* **1989**, 245, 646-648.
- [63] T. E. Ellenberger, C. J. Brandl, K. Struhl & S. C. Harrison, The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α helices: crystal structure of the protein-DNA complex, *Cell* **1992**, 71, 1223-1237.
- [64] a) M. Portwich, S. Keller, H. Strauss, C. C. Mahrenholz, I. Kretschmar, A. Kramer & R. Volkmer, A Network of Coiled-Coil Associations Derived from Synthetic GCN4 Leucine-Zipper Arrays, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1654.

- b) M. Portwich, Untersuchungen zur Assoziation des α -helikalen Coiled-Coil, *Dissertation* HU Berlin, **2004**.
- [65] X. Zeng, H. Zhu, H. A. Lashuel & J. C. Hu, Oligomerization properties of GCN4 leucine zipper e and g position mutants, *Protein Sci.* **1997**, 6, 2218-2226.
- [66] T. Pawson & J. D. Scott, Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins, *Science* **1997**, 278, 2075-2080.
- [67] G. B. Cohen, R. Ren & D. Baltimore, Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* **1995**, 80, 237-248.
- [68] M. J. Macias, M. Hyvonen, E. Baraldi, J. Schultz, M. Sudol, M Saraste, & H. Oshkinat, Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* **1996**, 382, 646-649.
- [69] M. Sudol, K. Sliwa & T. Russo, Functions of WW domains in nucleus, *FEBS Lett.* **2001**, 490, 190-195.
- [70] E. Levy, M. D. Carman, I. J. Fernandez-Madrid, M. D. Power, I. Lieberburg, S. G. van Duinen, G. T. Bots, W. Luyendijk & B. Frangione, Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type, *Science* **1990**, 248, 1124-1126.
- [71] P. J. Lu, G. Wulf, X. Z. Zhou, P. Davies & K. P. Lu, The prolyl isomerase pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* **1999**, 399, 784-788.
- [72] C. M. Cowan, L. A. Raymond, Selective neuronal degeneration in huntington's disease, *Curr. Top. Dev. Biol.* **2006**, 75, 25-71.
- [73] A. Zarrinpar, R. P. Bhattacharyya & W. A. Lim, The structure and function of proline recognition domains, *Sci. STKE* **2003**, 179, re8.
- [74] B. Aghazadeh & M. K. Rosen, Ligand recognition by SH3 and WW domains: the role of n-alkylation in ppi helices, *Chem. Biol.* **1999**, 6, R241-R246.
- [75] M. Sudol, C. C. Recinos, J. Abraczinskas, J. Humbert & A. Farooq, WW or WoW: The WW domains in a union of bliss, *IUBMB Life* **2005**, 57, 773 - 778.
- [76] O. Y. Feferoff, S. A. Townson, A. P. Golovanov, M. Baron & J. M. Avis, The structure and dynamics of tandem WW domains in a negative regulator of notch signaling, suppressor of deltex, *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 34991-5000.
- [77] V. Kanelis, N. A. Farrow, L. E. Kay, D. Rotin & Julie D. Forman-Kay, NMR studies of tandem WW domains of Nedd4 in complex with a PY motif-containing region of the epithelial sodium channel, *Cell Biol.* **1998**, 76, 341-350.

- [78] M. J. Macias, V. Gervais, C. Civera & H. Oschkinat, Structural analysis of WW domains and design of a WW prototype. *Nat Struct Biol* **2000**, 7, 375-379.
- [79] S. Holbert, I. Denghien, T. Kiechle, A. Rosenblatt, C. Wellington, M. R. Hayden, R. L. Margolis, C. A. Ross, J. Dausset, R. J. Ferrante & C. Neri, The Gln-Ala repeat transcriptional activator CA150 interacts with huntingtin: Neuropathologic and genetic evidence for a role in Huntington's disease pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 1811-1816.
- [80] C. Sune, T. Hayashi, Y. Liu, W. S. Lane, R. A. Young & M. A. Garcia-Blanco, CA150, a nuclear protein associated with the RNA polymerase II holoenzyme, is involved in Tat-activated human immunodeficiency virus type 1 transcription, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17, 6029-6039.
- [81] F. He, Y. Muto, M. Inoue, T. Kigawa, M. Shirouzu, T. Terada & S. Yokoyama, Solution structure of WW domain in transcription elongation regulator 1, Protein Datenbank **2009** (PDB: 2DK7).
- [82] a) J. Przedziak, S. Tremmel, I. Kretschmar, M. Beyermann, M. Bienert & R. Volkmer, Probing the ligand-binding specificity and analyzing the folding state of SPOT-synthesized FBP28 WW domain variants, *ChemBioChem* **2006**, 7, 780-788.
- b) J. Körner (Przedziak), Untersuchung zur Faltung, Stabilität und Bindungsverhalten kleiner β -Faltblattstrukturen am Beispiel der FBP28 WW-Domäne, *Dissertation* FU Berlin, **2007**.
- [83] a) L. Otte, U. Wiedemann, B. Schlegel, J. R. Pires, M. Beyermann, P. Schmieder, G. Krause, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener & H. Oschkinat, WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensities of 42 WW domains, *Protein Sci.* **2003**, 12, 491-500.
- b) L. Otte, Charakterisierung von WW-Domänen-Ligand-Wechselwirkungen mit Hilfe synthetischer Protein- und Peptidbibliotheken, *Dissertation* HU Berlin, **2004**.
- [84] N. Sreerama & R. W. Woody, Computation and analysis of protein circular dichroism spectra, *Methods Enzymol.* **2004**, 383, 318-351.
- [85] S. Beychok, Circular dichroism of biological macromolecules, *Science* **1966**, 154, 1288-1299.
- [86] L. Serrano-Andrés & M. P. Fülcher, Theoretical study of the electronic spectroscopy of peptides. 2. Glycine and N-Acetylglycine, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 118, 12200-12206.

- [87] L. Serrano-Andrés & M. P. Fülcher, Theoretical study of the electronic spectroscopy of peptides. III. Charge-transfer transitions in polypeptides, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 10912–10920.
- [88] S. Y. Lau, A. K. Taneja & R. S. Hodges, Synthesis of a model protein of defined secondary and quaternary structure. Effect of chain length on the stabilization and formation of two-stranded alpha-helical coiled-coils, *J Biol Chem.* **1984**, 259, 13253-61.
- [89] N. E. Zhou, C. M. Kay & R. S. Hodges, The role of interhelical ionic interactions in controlling protein folding and stability - De novo designed synthetic two-stranded α -helical coiled-coils, *J. Mol. Biol.* **1994**, 237, 500-512.
- [90] L. Whitmore & B. A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy, methods and reference database, *Biopolymers* **2007**, 89, 392-400.
- [91] A. J. Miles & B. A. Wallace, Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 39-51.
- [92] G. B. Fields, R. L. Noble. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-Fluorenyl-methoxy-carbonyl amino acids, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35, 161-214.
- [93] M. Quibell & T. Johnson, Difficult Peptides in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach (W.C. Chan. und P.D. White, Ed.), Oxford University Press, Oxford, **2000**, S. 115-136.
- [94] C. Hyde, T. Johnson, D. Owen, M. Quibell & R. C. Sheppard, Some difficult sequences made easy - a study of interchain association in solid-phase peptide-synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, 43, 431–440
- [95] a) E. Bayer, *Peptide Chemistry, Structure and Biology*, ESCOM Leiden **1994**, 156-158.
- b) G. Grüber, H. Straubinger, W. Reinig, H. Echner, M. Geiger & W. Voelter, *Solid Phase Synthesis*, (R. Epton, Ed.) Mayflower Worldwide, Oxford, **1994**, 191-196.
- c) G. Grüber, H. Zimmermann, H. Echner, S. Stoeva, E. Bernardi, B. Pourrias & W. Voelter, *Solid Phase Synthesis*, (R. Epton, Ed.) Mayflower Worldwide, Oxford, **1994**, 517-520.
- [96] E. Bayer & W. Rapp in *Chemistry of Peptides and Proteins*, (W. Voelter, E. Bayer, Y. A. Ovchinnikov, V.T. Ivanov, Ed.) Walter de Gruyter & Co., Berlin. New York, **1986**, 3, 3-8.

- [97] S. Tremmel, Design, Synthese und Stabilität von beta-Faltblatt Modellpeptiden, *Dissertation* Martin-Luther-Universität, **2005**.
- [98] W. R. Sampson, H. Patsiouras & N. J. Ede, The synthesis of 'difficult' peptides using 2-hydroxy-4-methoxybenzyl or pseudoproline amino acid building blocks: a comparative study. *J. Pept. Sci.* **1999**, 5, 403–409.
- [99] T. Rückle, P. de Lavallaz, M. Keller, P. Dumy & M. Mutter, Pseudo-prolines in cyclic peptides: Conformational stabilisation of *cyclo*[Pro-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Pro], *Tetrahedron* **1999**, 55, 11281–11288.
- [100] M. Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer, Berlin, **1984**.
- [101] N. Seewald & H. D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [102] a) C. Levinthal, Are there pathways for protein folding?, *J. Chim. Physique.* **1968**, 65, 44–45.
- b) K.A. Dill, Theory for the folding and stability of globular proteins, *Biochemistry* **1985**, 24, 1501–1509.
- [103] a) S. C. Harrison & R. Durbin, Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain?, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 4028–4030.
- b) M. Karplus & E. Shakhnovich, Protein folding: theoretical studies of thermodynamics and dynamics, *Protein Folding*. (T. Creighton, Ed.), W.H. Freeman & Sons, New York, **1992**, 127–195.
- [104] a) M. Vendruscolo, J. Zurdo, C. E. MacPhee & M. Dobson, Protein folding and misfolding: a paradigm of self-assembly and regulation in complex biological systems, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **2003**, 361, 1205–1222.
- b) C. M. Dobson, A. Sali & M. Karplus, Protein folding: a perspective from theory and experiment, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1998**, 37, 868–893.
- [105] J. M. Mason & K. M. Arndt, Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications, *ChemBioChem* **2004**, 5, 170–176.
- [106] L. Garnier & J. W. Wills, M. F. Verderame und M. Sudol, WW domains and retrovirus budding, *Nature* **1996**, 381, 744–745.
- [107] E. K. Koepf, H. M. Petrassi, M. Sudol & J. W. Kelly, WW: An isolated three-stranded antiparallel beta-sheet domain that unfolds and refolds reversibly; evidence for a structured hydrophobic cluster in urea and GdnHCl and a disordered thermal unfolded state. *Protein Sci.* **1999**, 8, 841–853.

- [108] M. Sudol, Structure and function of the WW domain, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1996**, 65, 113–132.
- [109] N. E. Zhou , B. Y. Zhu , C. M. Kay & R. S. Hodges, The two-stranded alpha-helical coiled-coil is an ideal model for studying protein stability and subunit interactions, *Biopolymers* **1992**, 32, 419-426.
- [110] N. E. Zhou, C. M. Kay & R. S. Hodges, Synthetic model proteins: positional effects of interchain hydrophobic interactions on stability of two-stranded α -helical coiled-coils, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 2664-2670.
- [111] M. O. Steinmetz, A. Stock, T. Schulthess, R. Landwehr, A. Lustig, J. Faix, G. Gerisch, U. Aebi & R. A. Kammerer, A distinct 14 residue site triggers coiled-coil formation in cortexillin I, *EMBO J.* **1998**, 17, 1883-1891.
- [112] M. C. W. Manning & R. Woody, Theoretical determination of the CD of proteins containing closely packed antiparallel β -sheets, *Biopolymers* **1987**, 26, 1731-1752.
- [113] R. W. Woody, The circular dichroism of peptides, *The peptides, analysis, synthesis and biology* (V. Hruby, Ed.), Academic Press, New York, **1985**, 15-104.
- [114] R. W. Woody, The circular dichroism of oriented β -sheets: Theoretical predictions, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 529-544.
- [115] R. W. Woody, Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins, *Eur. Biophys. J.* **1994**, 23, 253-262.
- [116] C. Krittanai & W. C. Johnson, Correcting the circular dichroism of peptides for contributions of absorbing side chains, *Anal. Biochem.* **1997**, 253, 57-64.
- [117] a) K. Reid, H. Rodriguez, B. Hiller & L. Gregoret, Stability and folding properties of a model β -sheet protein, *Escherichia coli CspA.*, *Protein Sci.* **1998**, 7, 470-479.
- [118] C. B. Anfinsen, Principles that govern the folding of protein chains, *Science* **1973**, 181, 223-230.
- [119] J. Y. Su, R. S. Hodges & C. M. Kay, Effect of chain length on the formation and stability of synthetic α -helical coiled-coils, *Biochemistry* **1994**, 33, 15501-15510.
- [120] D. Krylov, J. Barchi & C. Vinson, Inter-helical interactions in the leucine zipper coiled coil dimer: pH and salt dependence of coupling energy between charged amino acids, *J. Mol. Biol.* **1998**, 279, 959-972.
- [121] N. J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nature Protocols* **2006**, 1, 2876-2890.

- [122] a) N. Ferguson, J. Berriman, M. Petrovich, T. D. Sharpe, J. T. Finch & A. R. Fersht, Rapid amyloid fiber formation from the fast-folding WW domain FBP28, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 9814-9189.
- b) N. Ferguson, J. Becker, H. Tidow, S. Tremmel, T. D. Sharpe, G. Krause, J. Flinders, M. Petrovich, J. Berriman, H. Oschkinat & A. R. Fersht, General structural motifs of amyloid protofilaments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 16248-16253.
- [123] I. W. Hamley, Bildung von Peptidfibrillen, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 8274-8295.
- [124] M. M. Pierce, C. S. Raman & Barry T. Nall, Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions, *Methods* **1999**, 19, 213-221.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Dr. Rudolf Volkmer für die gute Betreuung und das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie die große kreative Freiheit bei der Durchführung dieser Arbeit. Seine immerwährende Unterstützung und die stetige Diskussionsbereitschaft möchte ich ganz besonders hervorheben.

Frau Prof. Dr. Beate Koksch danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens.

Prof. Dr. Sandro Keller danke ich für sein offenes Ohr und seine Hilfsbereitschaft in fachlichen Fragen.

Nadin Jahnke danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und fachliche Betreuung bei CD- und ITC-Experimenten.

Bei Dr. Peter Schmieder und Brigitte Schlegel bedanke ich mich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Ich danke allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Molekulare Bibliotheken“ für das gute Arbeitsklima und die fachlichen Diskussionen. Hervorgehoben seien hier besonders Juliane Lück, Dr. Armin Weiser und Judith Müller.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich bei Ülker Coşkun und ganz besonders bei Dr. Julian Gebauer.

Ich danke allen meinen Freunden, besonders Pelin Ersoy und Serpil Şahin, die immer für mich da waren.

Ganz besonders herzlich danke ich Julian und meiner Familie, die immer an mich geglaubt und mir neuen Mut gegeben haben.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version dieser Arbeit nicht veröffentlicht.

Veröffentlichungen

Publikationen

Z. Fidan, S. Keller, R. Volkmer, Synthesis of Modular Self-Assembling Small Proteins by Native Chemical Ligation. *Manuskript eingereicht*.

Z. Fidan, A. Younis, R. Volkmer, Chemical synthesis of the third WW domain of TCERG1 by native chemical ligation. *Journal of Peptide Science*. doi: 10.1002/psc.1383.

Z. Fidan, C. C. Mahrenholz, M. Portwich, R. Volkmer, Analysis of coiled-coil associations by SPOT technology. *Chemistry Today* **2008**, 26(2), 22-25.

Vorträge

“Synthesis and Evaluation of Novel Small Proteins: GCN4 Leucine-Zipper Directed Assembly of CA150 WW Domains”, 31. European Peptide Symposium, Kopenhagen, Dänemark, September 5-9, 2010

Posterbeiträge

Z. Fidan, S. Keller, R. Volkmer, Synthesis and Evaluation of Novel Small Proteins: GCN4 Leucine-Zipper Directed Assembly of CA150 WW Domains, 31. European Peptide Symposium, Kopenhagen, Dänemark, September 5-9, 2010

Z. Fidan, R. Volkmer, De Novo Design of Coiled Coil Based Structures by Native Chemical Ligation, 9. German Peptide Symposium, Göttingen, März 11-14, 2009

Z. Fidan, N. Ljeskovica, M. Portwich, G. Krause, R. Volkmer, Analyses of Coiled Coil Associations by SPOT Technology, 9. German Peptide Symposium, Göttingen, März 11-14, 2009

Z. Fidan, R. Volkmer, From Coiled Coil Interactions to Chemical Biology, 30. European Peptide Symposium, Helsinki, Finnland, 31. August – 5. September, 2010