

*O*-GLYKOSYLIERUNGEN UND DEPSIBINDUNGEN  
– FALTUNGSASPEKTE  $\alpha$ -HELIKALER COILED COIL-PEPTIDE –

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 JESSICA A. FALENSKI

aus Berlin, Deutschland

Oktober 2010

## DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. Koksche danke ich für das interessante und abwechslungsreiche Thema sowie die Betreuung der Arbeit und die gewährte wissenschaftliche Freiheit. Bei Herrn Prof. Dr. Haag möchte ich mich herzlich für die Übernahme der Begutachtung meiner Dissertation bedanken. Des Weiteren möchte ich mich bei beiden für die Unterstützung während meiner Schwangerschaft und Elternzeit bedanken.

Der Arbeitsgruppe danke ich für das stets *angenehme* Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. Mario Salwiczek für die zahlreichen inspirierenden Diskussionen sowie das Korrekturlesen des Manuskripts bedanken.

Herrn Dr. Carsten Baldauf möchte ich für die durchgeführten Moleküldynamiksimulationen danken. Mein Dank gilt des Weiteren Frau M.Sc. Ulla Gerling für die Durchführung und Auswertung der Ultrazentrifugationsexperimente, Frau Dr. Sara Wagner für die TEM Aufnahmen sowie Herrn Dr. Spengler für die Synthese der Depsipeptide.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann und meiner Familie für den Rückhalt, das Verständnis und die Unterstützung, welche Sie während des gesamten Studiums für mich aufgebracht haben.



1. Gutachterin: Prof. Dr. Beate Koksch (Freie Universität Berlin)

2. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Haag (Freie Universität Berlin)

Disputation am: 09.12.2010

## ERKLÄRUNG

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Beate Kokschi in der Zeit von November 2005 bis Oktober 2010 am Institut für Chemie und Biochemie des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Hiermit versichere ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „*O*-Glykosylierungen und Disulfidbindungen – Faltungsaspekte  $\alpha$ -helikaler *coiled coil*-Peptide“ selbstständig und ohne Benutzung anderer als der zugelassenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Alle aufgeführten Zitate sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt.

Berlin, 06.10.2010

Jessica Falenski

Aus dieser Dissertation gingen bisher folgende Veröffentlichungen hervor:

- ◆ **M. Broncel, J.A. Falenski, S.C. Wagner, C.P.R. Hackenberger, B. Kokschi,**  
*Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7881-7888.  
“How post-translational modifications influence amyloid formation: A systematic study of phosphorylation and glycosylation in model peptides”
  
- ◆ **J.A. Falenski, U.I.M. Gerling, B. Kokschi,**  
*Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18(11)*, 3703-3706.  
”Multiple glycosylation of *de novo* designed  $\alpha$ -helical coiled coil peptides”
  
- ◆ **J.A. Scheike, C. Baldauf, J. Spengler, F. Albericio, M.T. Pisabarro, B. Kokschi,**  
*Angewandte Chemie Int. Ed.* **2007**, *46(41)*, 7766-7769.  
*Angewandte Chemie* **2007**, *119(41)*, 7912-7916.  
“Amide-to-ester substitution in coiled coils – The effect of removing hydrogen bonds on protein structure”

Die Ergebnisse wurden des Weiteren auf folgenden Tagungen und Workshops präsentiert:

- ◆ **J.A. Falenski, M. Broncel, S.C. Wagner, C. Hackenberger, B. Kokschi,**  
*Tag der Chemie*, Potsdam, Deutschland, 4 Juni, **2009**.  
“How post-translational modifications influence amyloid formation: A systematic study of phosphorylation and glycosylation in model peptides”
  
- ◆ **J.A. Falenski, M. Broncel, S.C. Wagner, C. Hackenberger, B. Kokschi,**  
*9<sup>th</sup> German Peptide Symposium*, Göttingen, Deutschland, 11-14 März, **2009**.  
“How post-translational modifications influence amyloid formation: A systematic study of phosphorylation and glycosylation in model peptides”
  
- ◆ **J.A. Scheike, B. Kokschi,**  
*30<sup>th</sup> European Peptide Symposium*, Helsinki, Finnland, 31. August - 5. September, **2008**.  
“The influence of *O*-glycosylation on the folding and stability of  $\alpha$ -helical coiled coil peptides”

- ◆ **J.A. Scheike, J. Spengler, C. Baldauf, M.T. Pisabarro, F. Albericio, B. Kokschi,**  
*8<sup>th</sup> Tetrahedron Symposium*, Berlin, Deutschland, 26-29 Juni, **2007**.  
 “Effects of hydrogen-bond elimination on  $\alpha$ -helical coiled coil peptides”
  
- ◆ **J.A. Scheike, J. Spengler, C. Baldauf, M.T. Pisabarro, F. Albericio, B. Kokschi,**  
*Tag der Chemie*, Berlin, Deutschland, 27 Juni, **2007**.  
 “Effects of hydrogen-bond elimination on  $\alpha$ -helical coiled coil peptides”
  
- ◆ **J.A. Scheike, J. Spengler, C. Baldauf, M.T. Pisabarro, F. Albericio, B. Kokschi,**  
*8<sup>th</sup> German Peptide Symposium*, Heidelberg, Deutschland, 14-17 März, **2007**.  
 “Effects of hydrogen-bond elimination on  $\alpha$ -helical coiled coil Peptides”
  
- ◆ **J.A. Scheike, B. Kokschi,**  
*29<sup>th</sup> European Peptide Symposium*, Danzig, Polen, 3-8 September, **2006**.  
 “Two efficient ways to mask destabilizing interhelical electrostatic repulsions in  $\alpha$ -helical coiled coil peptides”

## LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN

- ◆ **M. Broncel, J.A. Falenski, S.C. Wagner, C.P.R. Hackenberger, B. Koksch,**  
*Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7881-7888.  
“How post-translational modifications influence amyloid formation: A systematic study of phosphorylation and glycosylation in model peptides”
  
- ◆ **J.A. Falenski, U.I.M. Gerling, B. Koksch,**  
*Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18(11)*, 3703-3706.  
”Multiple glycosylation of *de novo* designed  $\alpha$ -helical coiled coil peptides”
  
- ◆ **D.P.Weimann, H.D.F. Winkler, J.A. Falenski, B. Koksch, C.A. Schalley,**  
*Nature Chem* **2009**, *1*, 573-577.  
”Highly dynamic motion of crown ethers along oligolysine peptide chains”
  
- ◆ **J.A. Scheike, C. Baldauf, J. Spengler, F. Albericio, M.T. Pisabarro, B. Koksch,**  
*Angewandte Chemie Int. Ed.* **2007**, *46(41)*, 7766-7769.  
*Angewandte Chemie* **2007**, *119(41)*, 7912-7916.  
“Amide-to-ester substitution in coiled coils – The effect of removing hydrogen bonds on protein structure”
  
- ◆ **H. Abdoule-Carime, S. Gohlke, E. Fischbach, J. Scheike, E. Illenberger,**  
*Chem. Phys. Lett.* **2004**, *387(4-6)*, 267-270.  
“Thymine extention from DNA by subexcitation electrons“

## POSTER

- ◆ **J.A. Falenski, M. Broncel, S.C. Wagner, C. Hackenberger, B. Koksch,**  
*Tag der Chemie*, Potsdam, Deutschland, 4 Juni, **2009**.  
“How post-translational modifications influence amyloid formation: A systematic study of phosphorylation and glycosylation in model peptides”
  
- ◆ **J.A. Falenski, M. Broncel, S.C. Wagner, C. Hackenberger, B. Koksch,**  
*9<sup>th</sup> German Peptide Symposium*, Göttingen, Deutschland, 11-14 März, **2009**.  
“How post-translational modifications influence amyloid formation: A systematic study of phosphorylation and glycosylation in model peptides”
  
- ◆ **J.A. Scheike, B. Koksch,**  
*30<sup>th</sup> European Peptide Symposium*, Helsinki, Finnland, 31. August - 5. September, **2008**.  
“The influence of *O*-glycosylation on the folding and stability of  $\alpha$ -helical coiled coil peptides”
  
- ◆ **J.A. Scheike, J. Spengler, C. Baldauf, M.T. Pisabarro, F. Albericio, B. Koksch,**  
*8<sup>th</sup> Tetrahedron Symposium*, Berlin, Deutschland, 26-29 Juni, **2007**.  
“Effects of hydrogen-bond elimination on  $\alpha$ -helical coiled coil peptides”
  
- ◆ **J.A. Scheike, J. Spengler, C. Baldauf, M.T. Pisabarro, F. Albericio, B. Koksch,**  
*Tag der Chemie*, Berlin, Deutschland, 27 Juni, **2007**.  
“Effects of hydrogen-bond elimination on  $\alpha$ -helical coiled coil peptides”
  
- ◆ **J.A. Scheike, J. Spengler, C. Baldauf, M.T. Pisabarro, F. Albericio, B. Koksch,**  
*8<sup>th</sup> German Peptide Symposium*, Heidelberg, Deutschland, 14-17 März, **2007**.  
“Effects of hydrogen-bond elimination on  $\alpha$ -helical coiled coil peptides”
  
- ◆ **J.A. Scheike, B. Koksch,**  
*29<sup>th</sup> European Peptide Symposium*, Danzig, Polen, 3-8 September, **2006**.  
“Two efficient ways to mask destabilizing interhelical electrostatic repulsions in  $\alpha$ -helical coiled coil peptides”

## REFERAT

Die  $\alpha$ -helikale *coiled coil*-Struktur ist eines der am häufigsten in der Natur vorkommenden Faltungsmotive, das an einer Vielzahl von wichtigen Prozessen wie der viralen Membranfusion, der DNA Reparatur, der Muskelkontraktion und der Transkription beteiligt ist. *De novo* entworfene *coiled coil*-Peptide eignen sich aufgrund ihrer amphiphilen Natur und der bekannten Designprinzipien hervorragend als Modellsysteme für größere und komplexere biologisch relevante Proteine.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *de novo* entwickelte *coiled coil*-Peptide verwendet, um verschiedene Aspekte der Proteinfaltung zu untersuchen. In **Teil 1** wurde die kontextabhängige Bedeutung von Wasserstoffbrückenbindungen im Peptidrückgrat auf die Struktur- und Stabilität von Proteinen untersucht. Hierfür wurden Amidbindungen durch Esterbindungen ersetzt, um systematisch einzelne Wasserstoffbrücken zu eliminieren. Die thermodynamische Analyse der Depsipeptide, sowie die Moleküldynamik-Simulationen, zeigten, dass der Einfluss der Wasserstoffbrücken auf die Stabilität der Quartärstruktur in großem Maße von der Polarität der jeweiligen Umgebung abhängt. Im hydrophoben Milieu der Proteinumgebung sind die Wasserstoffbrücken wesentlich stärker als in solvatisierten Regionen des Proteinerückgrates. In **Teil 2** wurde der Einfluss der multiplen *O*-Glykosylierung auf die Faltung und Stabilität der *coiled coil*-Struktur untersucht. Hierfür wurden in eine 26 Aminosäuren lange Peptidsequenz systematisch ein bis sechs  $\beta$ -D-Galactosereste über die Serinseitenketten in den Positionen *b*, *c* und *f* des *Heptads* eingeführt. Aufgrund der geometrischen Vorgabe des *Heptad*-Wiederholungsmusters können die Liganden in einem definierten Abstand zueinander präsentiert werden. Die Studie zeigte, dass die *O*-Glykosylierung mit  $\beta$ -D-Galactose ohne signifikante Stabilitätsverluste toleriert wird und das *coiled coil*-Faltungsmotiv daher großes Potential als multivalente Gerüststruktur hat. Um weite Rezeptorabstände zu überbrücken und die Valenz des *coiled coil*-basierten Gerüsts zu erhöhen, wurde ein faserbildendes *coiled coil*-System entwickelt. Dieses besitzt eine einheitliche, aus Lysinresten bestehende elektrostatische Wechselwirkungsdomäne, die ein Überlappen der Helices ermöglicht. Anhand von *coiled coil*-basierten Modellpeptiden wurde in **Teil 3** der Einfluss der *O*-Glykosylierung auf die Amyloidaggregation studiert. Hierfür wurden ein bis drei  $\beta$ -D-Galactosereste in verschiedene Positionen der Sequenz eingeführt. Die mehrfache Glykosylierung konnte die Amyloidbildung inhibieren, wohingegen die einfache Glykosylierung positionsabhängig nur zu einer Verzögerung der Amyloidbildung führte.

## ABSTRACT

The  $\alpha$ -helical coiled coil folding motif is one of the most common in nature, and is involved in many important biological processes including virus-host cell membrane fusion, DNA repair, muscle contraction, and transcription. *De novo* designed peptides that form coiled coils are suitable model systems for larger and more complex biologically relevant proteins because of their amphiphilic nature and well-known design principles.

In this thesis, *de novo* designed coiled coil-forming peptides were used to investigate several aspects of protein folding. **Part 1** describes the context-dependent relevance of backbone hydrogen bonds in protein folding and stability. For this purpose, amide bonds were replaced with ester bonds to systematically eliminate specific hydrogen bonds. Thermodynamic analysis and molecular dynamics simulations showed that the contribution of main chain hydrogen bonds to quaternary structure stability largely depends on the environment. In accordance with small molecule studies in solution, main chain hydrogen bonds are significantly stronger in the interior of the hydrophobic interface than they are in the solvent exposed aqueous regions of the coiled coil. The influence of multiple *O*-glycosylation on the folding and stability of coiled coils was the focus of **part 2** of this thesis. One to six  $\beta$ -D-galactose residues were introduced as monosaccharides into a 26 amino acid peptide sequence *via* the serine side chains in positions *b*, *c*, and *f* of the heptad. The carbohydrate ligands are presented in a defined relative distance due to the geometric constraints of the heptad repeat. The study showed that *O*-glycosylation with  $\beta$ -D-galactose is well-tolerated and does not result in significant destabilization. Therefore, the coiled coil folding motif shows potential as a multivalent scaffold. Furthermore, to bridge long receptor distances and to extend the valence of the coiled coil-based scaffold, a fiber-forming coiled coil system was developed. In this system, the electrostatic recognition domain is composed exclusively of lysine residues, which enhances overlap between the helices. **Part 3** describes the use of coiled coil-based model peptides to investigate the influence of *O*-glycosylation on amyloid formation. One to three  $\beta$ -D-galactose residues were introduced at different sites in the peptide sequence. Multiple glycosylation results in complete inhibition of amyloid formation. Interestingly, single glycosylation slows down the aggregation process in a manner that depends on the position in the peptide sequence.



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>Abz</b>	o-Aminobenzoessäure
<b>AGE</b>	<i>advanced glycation end products</i>
<b>APP</b>	<i>amyloid precursor protein</i>
<b>ASGP-R</b>	Asiaglycoproteinrezeptor
<b>AUZ</b>	Analytische Ultrazentrifugation
<b>CD</b>	Circulardichroismus
<b>DIC</b>	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
<b>DIEA</b>	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EPL</b>	<i>expressed protein ligation</i>
<b>ESI</b>	Elektrospray-Ionisation
<b>Fmoc</b>	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
<b>GdnHCl</b>	Guanidinhydrochlorid
<b>GPI</b>	Glycosylphosphatidylinositol
<b>HOAt</b>	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole
<b>HOBt</b>	1-Hydroxybenzotriazol
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<b>MALDI</b>	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
<b>MD</b>	Moleküldynamik
<b>MS</b>	Massenspektrometrie
<b>MW</b>	<i>molecular weight</i>
<b>NMR</b>	<i>nuclear magnetic resonance</i>
<b>PGA</b>	Poly-L-Glutaminsäure
<b>RAFT</b>	regioselectively addressable functionalized template
<b>RP-HPLC</b>	<i>reverse phase high performance liquid chromatography</i>
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SAL</b>	<i>sugar assisted ligation</i>
<b>scFv</b>	<i>single chain variable fragment</i>
<b>SEC</b>	<i>size exclusion chromatography</i>
<b>SPPS</b>	<i>solid phase peptide synthesis</i>

<b>tRNA</b>	transfer-Ribonukleinsäuren
<b>TBTU</b>	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylamintetrafluoroborat
<b>ThT</b>	Thioflavin T
<b>TEM</b>	Transmissionselektronenmikroskopie
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>TIS</b>	Triisopropylsilan
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b><i>wt</i></b>	<i>wild type</i>
<b>Xaa</b>	Aminosäure allgemein

Die Drei- und Einbuchstabencodes der Aminosäuren wurden nach den Empfehlungen der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur verwendet (*Eur. J. Biochem.* **1984**, **138**, 9-37).

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>VORWORT</b> .....	<b>1</b>
<b>ZIELSTELLUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>TEIL 1</b> .....	<b>4</b>
<b>1 DAS „PROTEINFALTUNGSPROBLEM“</b> .....	<b>5</b>
1.1 WASSERSTOFFBRÜCKENBINDUNGEN .....	5
1.2 DER HYDROPHOBE EFFEKT .....	7
1.3 MODIFIZIERUNGEN DES PEPTIDRÜCKGRATS .....	7
1.3.1 <i>Depsi-Peptide</i> .....	9
<b>2 DAS <math>\alpha</math>-HELICALE COILED COIL</b> .....	<b>10</b>
<b>3 ESTERSUBSTITUTIONEN IN <math>\alpha</math>-HELIKALEN COILED COIL-PEPTIDEN</b> .....	<b>14</b>
3.1 <i>ANGEWANDTE CHEMIE INT. ED. 2007, 46(41), 7766-7769</i> .....	14
<b>TEIL 2</b> .....	<b>17</b>
<b>4 GLYKOPROTEINE</b> .....	<b>18</b>
4.1 GLYKOSIDISCHE BINDUNGEN .....	19
4.1.1 <i>O-Glykosidische Bindung</i> .....	20
4.1.2 <i>N-Glykosidische Bindung</i> .....	20
4.1.3 <i>Der GPI-Anker</i> .....	20
4.2 GLYKOPEPTIDSYNTHESE.....	21
4.2.1 <i>Die building-block-Strategie</i> .....	22
4.2.2 <i>Glykopeptidsynthese an der Festphase</i> .....	23
4.2.3 <i>Glykopeptidsynthese in Lösung</i> .....	23
<b>5 MULTIVALENZ</b> .....	<b>26</b>
5.1 MULTIVALENTE PROTEIN-KOHLLENHYDRAT WECHSELWIRKUNGEN .....	26
5.2 THERMODYNAMIK MULTIVALENTER WECHSELWIRKUNGEN .....	26
5.3 MULTIVALENTE PEPTIDRÜCKGRAT BASIERTE GERÜSTSTRUKTUREN .....	28
5.3.1 <i>Ungeordnete Gerüststrukturen</i> .....	29
5.3.2 <i>Helikale Gerüststrukturen</i> .....	31
5.3.3 <i>Zyklische Gerüststrukturen</i> .....	32
5.3.4 <i>Vor- und Nachteile Peptid-basierter Gerüststrukturen</i> .....	36
<b>6 GLYKOSYLIERTE COILED COIL-PEPTIDE ALS MULTIVALENTE GERÜSTSTRUKTUREN</b> .....	<b>37</b>
6.1 KONZEPT .....	37
6.2 GLYKOPEPTIDSYNTHESE.....	38
6.2.1 <i>Synthese des Glykosyl-Aminosäure-Bausteines (Gal-)Ser</i> .....	38
6.2.2 <i>Festphasenpeptidsynthese der Glykopeptide</i> .....	38

6.3	<i>BIOORG. MED. CHEM.</i> 2010, 18(11), 3703-3706.....	39
6.4	DESIGN EINES FASERBILDENDEN MULTIVALENTEN <i>COILED COIL</i> -PEPTIDS.....	42
6.4.1	<i>Peptid J10</i> .....	43
6.4.2	<i>Bedeutung der Aminosäureseitenkettenlänge in den Positionen e und g</i> .....	44
6.4.3	<i>Peptid GKS</i> .....	46
6.4.4	<i>Peptid GKS-3/17</i> .....	48
<b>TEIL 3</b> .....		<b>50</b>
<b>7</b>	<b>AMYLOIDE</b> .....	<b>51</b>
7.1	ALZHEIMER / AMYLOID B.....	51
7.2	STRUKTUR DER AMYLOIDE.....	53
7.3	MODELLPEPTIDE ZUR UNTERSUCHUNG DER AMYLOID-AGGREGATION.....	54
7.3.1	<i>Das <math>\alpha</math>-helikale coiled coil als Amyloid-Modellsystem</i> .....	55
7.3.2	<i>Amyloid-basierte Biomaterialien</i> .....	56
<b>8</b>	<b>DIE BEDEUTUNG VON O-GLYKOSYLIERUNGEN IN DER AMYLOID-AGGREGATION</b> .....	<b>57</b>
8.1	<i>CHEM. EUR. J.</i> 2010, 16, 7881-7888.....	57
<b>9</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b> .....	<b>60</b>
<b>10</b>	<b>METHODEN ZUR STRUKTURBESTIMMUNG VON PROTEINEN</b> .....	<b>65</b>
10.1	CIRCULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE.....	67
10.1.1	<i>Physikalischer Hintergrund</i> .....	67
10.1.2	<i>Proteinstrukturanalyse</i> .....	69
10.2	THF-FLUORESZENZ.....	71
10.3	GRÖßENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE.....	74
10.3.1	<i>Bestimmung von Molekulargewichten</i> .....	74
10.3.2	<i>Versuchsparameter</i> .....	76
10.3.3	<i>Trenngele</i> .....	77
10.4	ANALYTISCHE ULTRAZENTRIFUGATION.....	77
10.4.1	<i>Physikalischer Hintergrund</i> .....	77
10.4.2	<i>Instrumenteller Aufbau</i> .....	79
10.4.3	<i>Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment</i> .....	80
10.4.4	<i>Sedimentationsgleichgewichts-Experimente</i> .....	80
10.5	TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	81
10.5.1	<i>Instrumentelle Grundlagen</i> .....	81
10.5.2	<i>Probenpräparation</i> .....	81
<b>11</b>	<b>METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG DER PROTEINSTABILITÄT</b> .....	<b>83</b>
11.1	THERMODYNAMISCHE ANALYSE DER PROTEINFALTUNG MITTELS DER CD-SPEKTROSKOPIE.....	85
11.2	MOLEKÜLDYNAMIK COMPUTERSIMULATIONEN.....	88
<b>12</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>89</b>

## VORWORT

Eine der größten wissenschaftlichen Herausforderungen ist es, die Zusammenhänge zwischen einer Proteinsequenz und deren Struktur und Funktion zu entschlüsseln. Sind diese bekannt, hat man ein Instrument in der Hand, mit dessen Hilfe man auch neue Proteine mit neuen Strukturen und Funktionen generieren kann. Mit diesem Feld der Forschung beschäftigt sich das Protein Design.

Beim Protein Design unterscheidet man zwischen zwei Herangehensweisen: Protein Engineering und *de novo* Protein Design. Bei ersterem werden auf Grundlage eines bekannten natürlichen Proteins oder Proteinabschnitts Mutationen in der Aminosäuresequenz vorgenommen und deren Auswirkungen auf die Struktur und Funktion beobachtet. Die Mutation kann schrittweise an spezifischen Positionen erfolgen; hierbei spricht man von rationalem Protein Design. Alternativ können aber auch mehrere Mutationen gleichzeitig eingeführt werden, entweder gezielt in einem Proteinabschnitt (*saturation mutagenesis*) oder zufallsbasiert über die gesamte Proteinsequenz (*random mutagenesis*). Aus der sich hieraus ergebenden Bibliothek können die Varianten mit den gewünschten Eigenschaften selektiert werden. Dieser kombinatorische Ansatz wird daher als gerichtete Evolution bezeichnet. Im Gegensatz zum Protein Engineering wird beim *de novo* Protein Design versucht, eine komplett neue Sequenz auf dem Reißbrett zu entwerfen, die die gewünschte Struktur und wenn möglich auch Funktion hat. Der aktuelle Stand der Wissenschaft erlaubt heute aber hauptsächlich ein *de novo* Protein Design auf struktureller Ebene. Sowohl das Protein Engineering als auch das *de novo* Protein Design werden häufig durch computerbasierte Modellberechnungen unterstützt.<sup>[1]</sup>

Es gibt eine Vielzahl von Motivationen sich mit dem Thema Protein Design zu beschäftigen:

1. Protein Design eröffnet die Möglichkeit, die Erkenntnisse aus der Proteinfaltung auf ihre Allgemeingültigkeit zu testen.
2. Durch das Entwickeln geeigneter einfacher Modellsysteme können komplexe Probleme der Proteinfaltung untersucht werden.
3. Die Stabilität bekannter Proteine kann für die pharmazeutische Anwendung durch Protein-Redesign gesteigert und deren Funktionen moduliert werden.<sup>[2-4]</sup>

4. Protein Design ermöglicht den Zugang zu unbekanntem Strukturen und Funktionen für therapeutische Anwendungen in der Medizin sowie für die Materialwissenschaften.

Die  $\alpha$ -helikale *coiled coil*-Struktur ist ein omnipräsentes Faltungsmotiv, welches an einer Reihe von wichtigen biologischen Prozessen wie z.B. der viralen Membranfusion<sup>[5, 6]</sup> oder der DNA Reparatur<sup>[7, 8]</sup> beteiligt ist. Die vorliegende Arbeit bedient sich *de novo* entwickelter *coiled coil*-Peptide, um verschiedene Aspekte der Proteinfaltung zu untersuchen:

- ◆ In **Teil 1** wird die kontextabhängige Bedeutung von Wasserstoffbrückenbindungen mit der Hilfe von Depsipeptiden untersucht. Hierbei dient die amphiphile *coiled coil*-Struktur mit ihrer hydrophoben Kernstruktur und ihren hydrophilen Helixflanken als Modell für komplexere globuläre Proteine.
- ◆ **Teil 2** beschäftigt sich mit *O*-glykosylierten *coiled coil*-Peptiden. Zum einen wird hier der Einfluss auf die Faltung und Stabilität der *coiled coil*-Struktur beleuchtet; zum anderen werden *coiled coil*-basierte multivalente Gerüststrukturen entwickelt, welche viel versprechende Eigenschaften für den pharmakologischen Einsatz oder für Anwendungen in den Materialwissenschaften haben.
- ◆ Anhand von *coiled coil*-basierten Modellpeptiden wird in **Teil 3** der Einfluss von *O*-Glykosylierungen auf die Amyloidaggregation studiert.

### ZIELSTELLUNG

*De novo* entworfene *coiled coil*-Peptide eignen sich aufgrund ihrer amphiphilen Natur und der bekannten Designprinzipien hervorragend als Modellsysteme für Proteine. Im Rahmen dieser Arbeit war die Bedeutung von Wasserstoffbrückenbindungen in der natürlichen Proteinumgebung von Interesse. Hierfür sollten die thermodynamischen Stabilitäten von Depsipeptiden, bei welchen systematisch einzelne Wasserstoffbrückenbindungen in den hydrophoben als auch hydrophilen Domänen des *coiled coil*-Motivs mittels Amid-zu-Ester-Substitution eliminiert wurden, bestimmt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse können einen Beitrag zur Lösung des Proteinfaltungsproblems liefern.

Trotz der intensiven Forschung der letzten Jahrzehnte auf dem Gebiet der *coiled coil*-Strukturcharakterisierung, blieb bis heute der Aspekt der Glykosylierung weitgehend unbeleuchtet. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher systematische Untersuchungen über den Einfluss der *O*-Glykosylierung in den hydrophilen Positionen der *coiled coil*-Struktur auf die Faltung und Stabilität unternommen werden. Des Weiteren sollten, aufbauend auf den hier gewonnen Ergebnissen, multivalente *coiled coil*-basierte Gerüststrukturen entwickelt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von *O*-glykosylierten *Switch-peptiden*.<sup>[9]</sup> Diese *coiled coil*-basierten Modellpeptide wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kokschi entwickelt und ermöglichen die Untersuchung der Amyloidaggregation. Um Rückschlüsse auf den Einfluss der *O*-Glykosylierung bei der Amyloidaggregation zu ziehen, sollten  $\beta$ -D-Galactosereste in die dem Lösungsmittel exponierten Positionen der *coiled coil*-Modellpeptide eingeführt werden und der Einfluss der Kohlenhydrateinheiten auf die Struktur und Faltungskinetik studiert werden.

# TEIL 1

AMID-ZU-ESTER-SUBSTITUTIONEN IN COILED COIL-PEPTIDEN



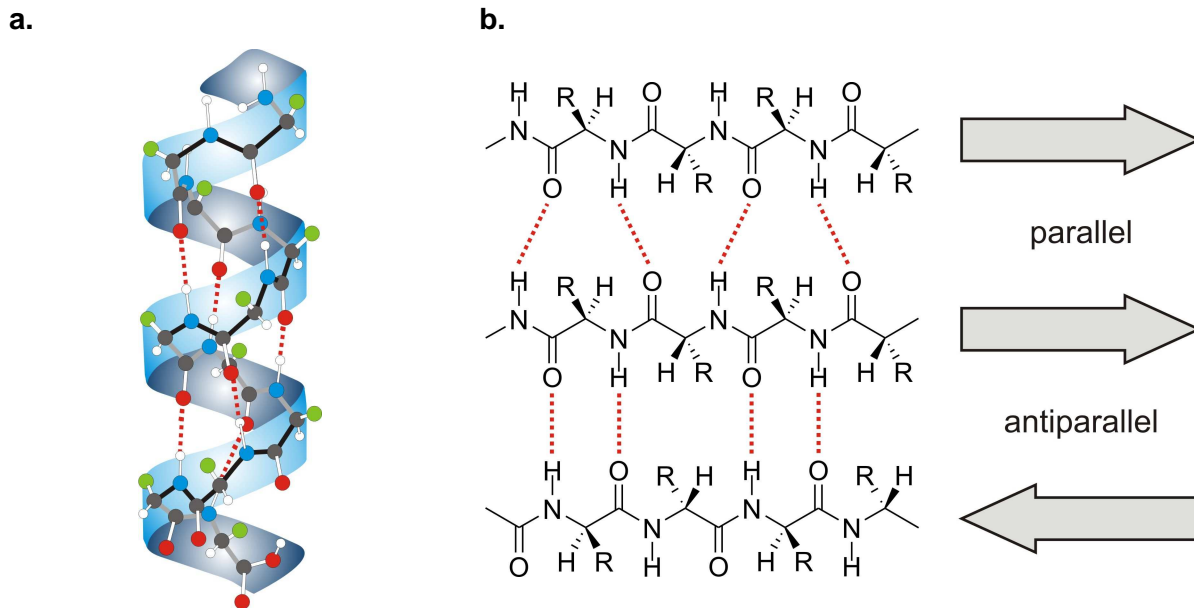
## 1 DAS „PROTEINFALTUNGSPROBLEM“

Unter physiologischen Bedingungen nehmen Proteine spontan ihre native dreidimensionale Struktur ein. Diese wird allein durch die Aminosäuresequenz des Proteins codiert, wenngleich molekulare Chaperone der Faltung assistieren können. Trotz intensiver Forschung ist der zugrunde liegende komplexe molekulare Mechanismus der Proteinfaltung noch nicht entschlüsselt. Diesen Umstand bezeichnet man als das „Proteinfaltungsproblem.“ Es wird unter anderem kontrovers diskutiert, welches die hauptsächliche Triebkraft für die Proteinfaltung ist.<sup>[10]</sup> Das Augenmerk der Wissenschaftler konzentriert sich hierbei auf zwei nicht-kovalente Wechselwirkungen in Proteinen: (1) die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und (2) den so genannten hydrophoben Effekt.<sup>[10-12]</sup> Da die Funktion von Proteinen an ihre Struktur gekoppelt ist, ist ein detailliertes molekulares Verständnis über die energetischen Beiträge zur Proteinstabilität von ausgesprochen hohem Interesse.

### 1.1 Wasserstoffbrückenbindungen

Schon 1936 schrieben Mirsky und Pauling: „...a native protein molecule...is folded into a uniquely defined configuration, in which it is held by hydrogen bonds between the peptide nitrogen and oxygen atoms ....The importance of the hydrogen bond in protein structure can hardly be overemphasized“.<sup>[13]</sup> Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Proteinrückgrats sind das charakteristische Merkmal von definierten Proteinstrukturen. Hierbei agiert das Amidproton (N-H) als H-Brücken-Donator und das Carbonylsauerstoffatom (C=O) als H-Brücken-Akzeptor. In gefalteten Proteinen sind zwei Drittel aller intramolekularen H-Brückenbindungen in repetitiven Sekundärstrukturelementen wie der  $\alpha$ -Helix und dem  $\beta$ -Faltblatt zu finden.<sup>[14]</sup> Abbildung 1 zeigt die charakteristischen Wasserstoffbrückenmuster dieser beiden Sekundärstrukturelemente. Die  $\alpha$ -Helix wird durch intrahelikale H-Brückenbindungen entlang der Helixachse zwischen dem n-ten Carbonylsauerstoffatom und dem (n+4)-ten Amidproton in der Aminosäurekette stabilisiert (siehe Abbildung 1 a). Die durchschnittliche Länge dieser H-Brückenbindungen, gemessen zwischen dem Amidproton und dem Carbonylsauerstoffatom, beträgt 2,06 Å.<sup>[15]</sup> Die funktionellen Seitenketten der Aminosäuren zeigen von der Helixachse weg nach außen. Beim  $\beta$ -Faltblatt können die einzelnen  $\beta$ -Stränge entweder parallel oder antiparallel zueinander angeordnet sein, wodurch sich jeweils ein unterschiedliches H-Brückenbindungsmuster ergibt (siehe Abbildung 1 b).

Die durchschnittliche Länge der H-Brückenbindungen im  $\beta$ -Faltblatt ist mit 1,96 Å etwas kürzer als in der  $\alpha$ -Helix.<sup>[15]</sup> Die Aminosäureseitenketten liegen zwischen zwei Strängen sehr dicht beieinander, sodass hier kleine hydrophobe Reste bevorzugt sind. In globulären Proteinen sind diese Sekundärstrukturen über Verbindungselemente wie z.B.  $\beta$ -Schleifen miteinander verbunden.



**Abbildung 1:** (a) Modell einer  $\alpha$ -Helix; C (grau), O (rot), N (blau), H (weiß) und Aminosäurereste R (grün); die intermolekularen H-Brückenbindungen sind rot gepunktet eingezeichnet. (b) Paralleles (oben) und antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt (unten) mit ihren unterschiedlichen H-Brückenbindungsmuster (rot gepunktet).

Das Carbonylsauerstoffatom kann durch seine beiden freien Elektronenpaare an bis zu zwei H-Brücken beteiligt sein. Statistische Auswertungen haben gezeigt, dass in einem gefalteten Protein jeder Aminosäurerest durchschnittlich in 1,1 H-Brücken involviert ist, von denen die Mehrzahl von ca. 68 % im Proteinrückgrat ausgebildet werden.<sup>[16]</sup> Die Energiebeiträge einer H-Brückenbindung zur Proteinstabilität liegen im Mittel zwischen -0.5 und -2 kcal mol<sup>-1</sup>.<sup>[10, 11]</sup> Die Bildung einer hydrophoben Packung stellt kein Ausschlusskriterium für die parallele Ausbildung von intramolekularen H-Brückenbindungen dar. Im Gegenteil, würden die Amid- und Carbonylgruppen des Rückgrats diese im hydrophoben Molekülinneren nicht ausbilden, so würde eine Proteinfaltung zugunsten von H-Brückenbindungen mit den Wassermolekülen des Lösungsmittels stattfinden. Kürzlich zeigten Gao *et al.*, dass

eine H-Brückenbindung um bis zu  $1,2 \text{ kcal mol}^{-1}$  verstärkt werden kann, wenn sie nicht solvatisiert ist, sondern sich in einer hydrophoben Umgebung befindet.<sup>[17]</sup>

## 1.2 Der hydrophobe Effekt

1959 änderte ein Review von Kauzmann die langläufige Meinung, dass H-Brückenbindungen die Haupttriebkraft für die Faltung globulärer Proteine sind.<sup>[18]</sup> Von da an setzte sich das Meinungsbild durch, dass die Abschirmung von hydrophoben Resten im Molekülinneren einen erheblichen Energiebeitrag zur Stabilisierung von Proteinstrukturen liefert. Die verringerte Kontaktfläche der hydrophoben Reste zum Lösungsmittel Wasser führt zu einem Entropiegewinn der nun freier beweglichen Wassermoleküle. Globuläre Proteine besitzen eine ähnlich hohe Packungsdichte wie die Kristalle kleiner organischer Moleküle.<sup>[19]</sup> Röntgenstrukturanalysen von Proteinen zeigen, dass die vom Lösungsmittel abgeschirmten Seitenketten im Molekülinneren wie in einem Puzzle ineinander verschachtelt sind. So können van der Waals Wechselwirkungen zwischen den dicht gepackten hydrophoben Resten einen zusätzlichen Energiebeitrag zur Stabilisierung der Proteinstruktur beitragen.<sup>[20]</sup> Durchschnittlich sind 86% aller Kohlenstoff- und Schwefelatome, 40% aller neutralen und 32% aller geladenen Sauerstoff- und Stickstoffatome in globulären Proteinen vom Lösungsmittel abgeschirmt.<sup>[11]</sup>

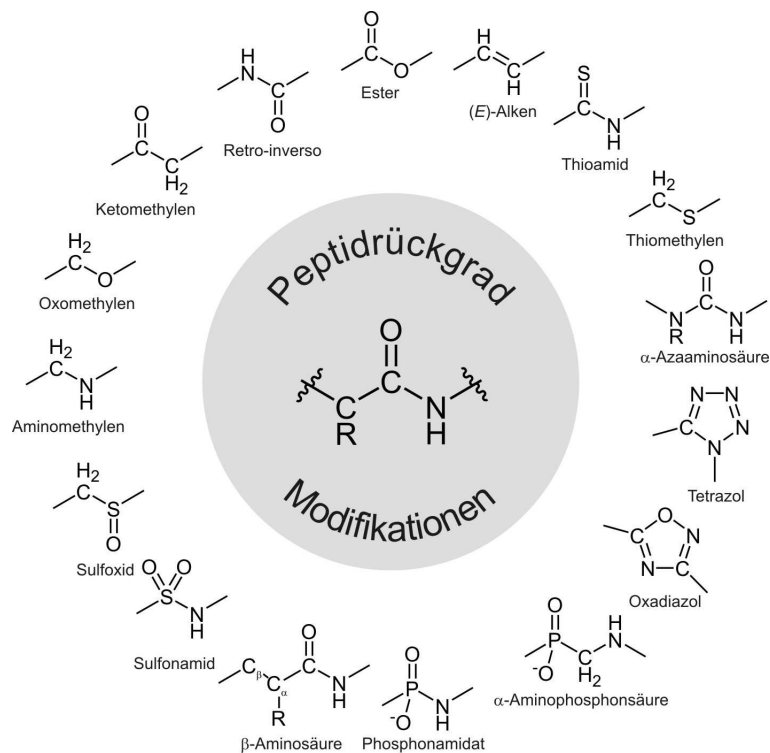
## 1.3 Modifizierungen des Peptidrückgrats

Die Modifizierung des Peptidrückgrats basiert meist auf einer oder mehrerer isosterischer oder isoelektronischer Substitutionen der Amidbindungen. Die Peptidkette kann aber auch durch zusätzliche Gruppen erweitert werden. Die Motive, dies zu tun, lassen sich wie folgt zusammenfassen:<sup>[21]</sup>

- ◆ Selektive Einflussnahme auf bestimmte Wechselwirkungsdomänen zur Aufklärung von thermodynamischen Energiebeiträgen, Strukturen oder Wirkungsmechanismen.
- ◆ Erhöhung der metabolischen Stabilität gegenüber Proteasen und damit verbundene längere Bioverfügbarkeit von Peptid-Therapeutika im menschlichen Organismus.

- ◆ Steigerung der Bioverfügbarkeit durch Erhöhung der Lipophilie und damit verbesserte Aufnahme von peptidbasierten Therapeutika durch die Zellmembran.
- ◆ Fixierung der Peptidkonformation zur Erhöhung der Selektivität und Aktivität. Daraus folgend Inhibierung von biomedizinisch wichtigen Protein-Protein-Interaktionen.<sup>[22]</sup>
- ◆ Erschaffung neuer Sekundärstrukturen - so genannter *Foldamere* – die durch ihren Aufbau aus unnatürlichen Bausteinen zudem Vorteile wie z.B. Proteasestabilität gegenüber den natürlichen Systemen besitzen.<sup>[23]</sup>
- ◆ Synthese von neu funktionalisierten Biopolymeren für Anwendungen in den Biomaterialwissenschaften und in der Nanotechnologie.

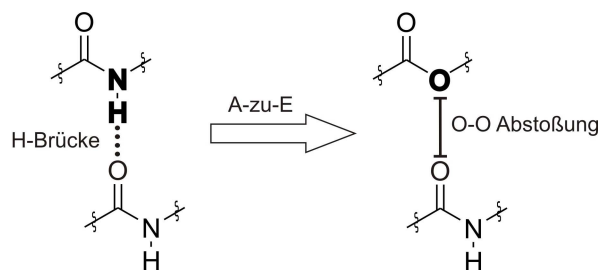
Abbildung 2 zeigt eine Auswahl von Peptidrückgrat-Substitutionen. Anwendung finden zahlreiche dieser Modifikationen in den so genannten Peptidmimetika. Dies sind niedermolekulare, von Peptiden abgeleitete Substanzen, die aufgrund ihrer Struktur die biologische Funktion von Peptiden nachahmen.



**Abbildung 2:** Strukturen einiger ausgewählter Modifizierungen der Peptidbindung.

### 1.3.1 Depsi-Peptide

Tauscht man bei der Peptidsynthese eine oder mehrere Aminosäuren durch ihre korrespondierende  $\alpha$ -Hydroxysäure aus, erhält man anstelle der Amidbindungen eine Esterbindung (siehe Abbildung 3). Solche Peptide nennt man Depsi-Peptide und in Analogie hierzu bezeichnet man eine Esterbindung im Peptidrückgrat auch als Depsibindung.<sup>[24]</sup> In der Natur kommen Depsipeptide als metabolisches Produkt von Mikroorganismen vor. Sie haben zumeist viel versprechende antibakterielle, antivirale, antifugale oder entzündungshemmende Eigenschaften, sowie ein großes Potential für die Krebstherapie.<sup>[25-27]</sup> Die meisten Depsipeptide sind heterodetische Cyclopeptide, welche aus alternierenden Resten von  $\alpha$ -Aminosäuren und  $\alpha$ -Hydroxysäuren bestehen. Die Esterfunktionalität hat viele strukturelle Gemeinsamkeiten mit der Amidbindung. Beide sind planar, haben ähnliche Bindungslängen und bevorzugen die *trans*-Konformation. Im Unterschied zum Amid besitzt der Ester allerdings keinen Wasserstoffbrücken-Donor und auch die Akzeptorstärke des Carbonylsauerstoffatoms ist vermindert. Die Amid-zu-Ester-Substitution hat sich daher hervorragend dazu bewährt, den kontextabhängigen Einfluss einzelner Wasserstoffbrückenbindungen auf eine Proteinstruktur zu evaluieren.<sup>[28-31]</sup>



**Abbildung 3:** Illustration einer Amid-zu-Ester-Substitution (A-zu-E) im Peptidrückgrat. Die eingeführte Depsibindung hat die Eliminierung einer Wasserstoffbrückenbindung und die einhergehende O-O-Abstoßung zwischen dem Ester- und dem Carbonyl-Sauerstoffatom zufolge.

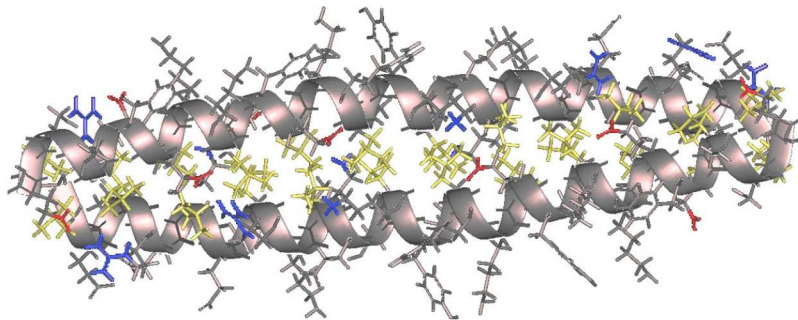
Möchte man innerhalb eines Systems die Energiebeiträge einzelner Wasserstoffbrückenbindungen ermitteln, genügt es die Stabilitäten der verschiedenen A-zu-E Mutanten direkt untereinander zu vergleichen. Die hierfür benötigten Depsipeptide sind über den Einbau von geschützten  $\alpha$ -Hydroxysäuren mittels der automatisierten Festphasenpeptidsynthese zugänglich.<sup>[32-34]</sup> Wenn man allerdings Absolutwerte der Wasserstoffbrückenbindungsenergien an der freien Energie der Faltung erhalten möchte, muss man die ermittelten Energiewerte

noch um die Beiträge der Desolvatationsenergieänderung und der *O-O*-Abstoßungsenergie zwischen dem Estersauerstoffatom und dem Carbonylsauerstoffatom korrigieren (siehe G-1).<sup>[15, 35]</sup>

$$\Delta G_{f, H\text{-Bindung}} = \Delta G_{f, wt} - \Delta G_{f, depsi} - 0.5\Delta\Delta G_{\text{Desolvation, Amid vs. Ester}} + \Delta G_{O-O\text{-Abstoßung}} \quad \mathbf{G-1}$$

## 2 DAS $\alpha$ -HELIKALE COILED COIL

Die  $\alpha$ -helikale *coiled coil*-Struktur ist eines der am häufigsten in der Natur vorkommenden Faltungsmotive. Sie wird von 3-5% aller Aminosäuren in Proteinen ausgebildet,<sup>[36]</sup> ist an einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie Muskelkontraktion, Transkription und Metabolismen beteiligt und übernimmt Aufgaben in Membrankanälen und Chaperonen.<sup>[37-41]</sup> Das erste Mal wurde die  $\alpha$ -helikale *coiled coil*-Struktur 1953 von Crick beschrieben, beruhend auf einer Röntgenstrukturanalyse eines  $\alpha$ -helikalen Faserproteins.<sup>[42]</sup>

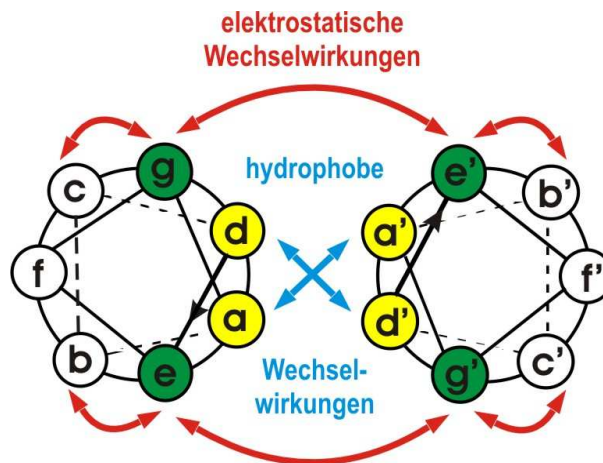


**Abbildung 4:** Struktur eines  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Dimers.

Die  $\alpha$ -helikale *coiled coil*-Struktur besteht aus zwei bis sieben rechtsgängigen  $\alpha$ -Helices, die sich links umeinander winden und eine Art Superhelix bilden (siehe Abbildung 4). Die Sequenz ist geprägt durch die periodisch wiederkehrende Anordnung von sieben Aminosäuren, dem so genannten *heptad repeat*, mit der Bezeichnung  $(a-b-c-d-e-f-g)_n$ . Hierbei bilden hydrophobe (H) und polare (P) Aminosäuren ein charakteristisches HPPHPPP-Muster aus. Alle 3,5 Aminosäurereste folgt demnach ein hydrophober Rest. Dadurch bildet sich an den einzelnen Helixsträngen jeweils eine hydrophobe Flanke aus, welche dann miteinander assoziieren können. Da aber bei einer rechtsgängigen  $\alpha$ -Helix normalerweise 3,6 Amino-

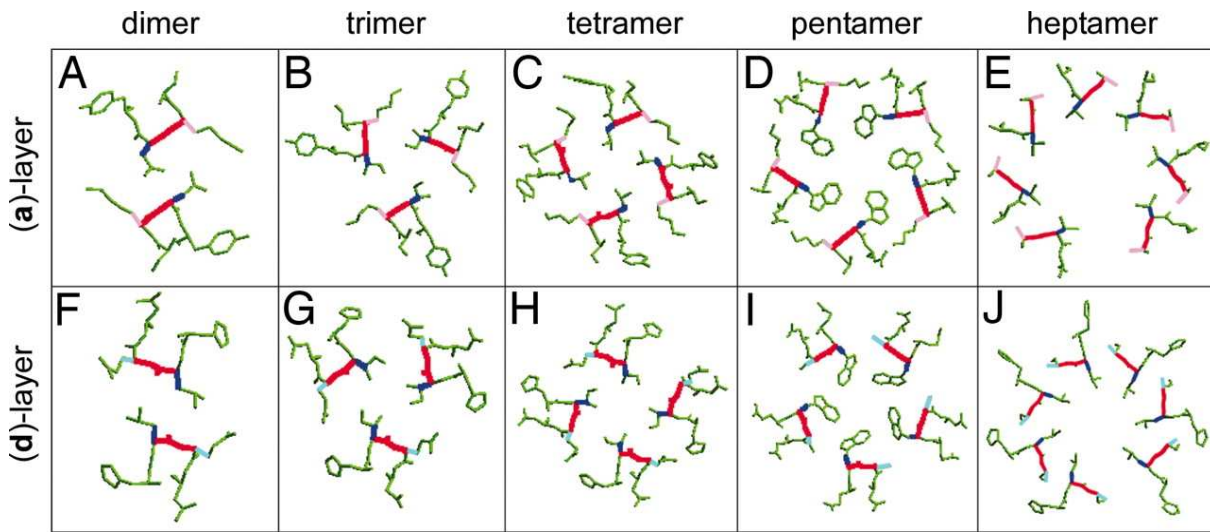
säurereste auf eine Schraubenwindung entfallen, kommt es zu der erwähnten Super-spiralisierung der Helices. Die Anzahl  $n$  der Wiederholungen des *Heptads* reicht von zwei in Modellpeptiden bis 200 in natürlichen Proteinen.<sup>[36, 43]</sup> Diese Periodizität der  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Struktur erlaubte es, allgemeingültige Regeln zum Aufbau zu finden. Hodges *et al.* präsentierten 1981 das erste *de novo* entworfene *coiled coil*-Peptid.<sup>[44]</sup> Nachfolgend werden die wichtigsten Design-Prinzipien vorgestellt.

$\alpha$ -Helikale *coiled coil*-Peptide werden typischerweise als *Helical-Wheel*-Modell dargestellt. Abbildung 5 zeigt ein solches Dimer-Modell mit seinen drei Wechselwirkungsdomänen.



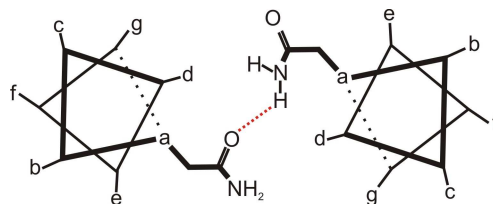
**Abbildung 5:** *Helical-Wheel-Darstellung eines parallelen coiled coil-Dimers.*

Die Positionen **a** und **d** werden im Allgemeinen von hydrophoben Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin, Valin und Methionin besetzt ( $i, i-3$  /  $i, i+4$  hydrophobes Muster). In wässriger Lösung bilden die Aminosäuren in diesen Positionen die hydrophobe Wechselwirkungsdomäne, welche die hauptsächliche thermodynamische Triebkraft für die Bildung einer  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Struktur ist. Die Seitenketten der hydrophoben Aminosäurereste der einen Helix fügen sich in die komplementären Hohlräume der anderen Helix ein und bilden ein so genanntes *knobs-into-holes*-Muster<sup>[45]</sup> (siehe Abbildung 6).  $\beta$ -Verzweigte Aminosäuren wie Valin treten in natürlich vorkommenden Peptiden und Proteinen häufig in Position **a** auf, wogegen sich  $\gamma$ -verzweigte Aminosäuren wie Leucin hauptsächlich in der Position **d** befinden.<sup>[46]</sup>



**Abbildung 6:** *Knobs-into-holes* Packung  $\alpha$ -helikaler coiled coil-Peptide; aus Liu et al. (Copyright © 2006 by The National Academy of Science of the USA).<sup>[47]</sup>

Die Stabilität der  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Struktur nimmt mit dem Prozentsatz der hydrophoben Aminosäuren in den Positionen *a* und *d* zu.<sup>[48]</sup> In natürlich vorkommenden  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Strukturen sind 80% dieser Positionen von hydrophoben Aminosäureresten besetzt.<sup>[49, 50]</sup> Ein kleiner Teil der hydrophoben Wechselwirkungsdomäne ist aber häufig auch von polaren Aminosäureresten besetzt. Auf Kosten der Stabilität des  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Dimer kann dadurch die Spezifität (parallele bzw. antiparallele Ausrichtung, Homo- bzw. Heteromer) erhöht werden.<sup>[51]</sup> Ein Beispiel hierfür ist der Leucin Zipper-Abschnitt des Gen-Regulationsproteins der Hefe namens GCN4, in dem sich in einer *a*-Position ein Asparaginrest befindet. Wenn dieser durch einen Valinrest ausgetauscht wird erhöht sich die thermische Stabilität um 40°C. Allerdings geht ohne die interhelikale Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Asparaginresten in der hydrophoben Wechselwirkungsdomäne (Abbildung 7) die Dimerisierungsspezifität verloren.<sup>[52]</sup>



**Abbildung 7:** Wasserstoffbrücke (rot gepunktet) zwischen zwei Asparaginresten innerhalb der hydrophoben Wechselwirkungsdomäne.



Im Gegensatz zu den Positionen *a* und *d* sind die Positionen *e* und *g* üblicherweise mit geladenen oder polaren Aminosäuren wie Lysin und Glutamat besetzt. Zwischen den Positionen *e/g'* und *g/e'* (parallele Anordnung) bzw. *e/e'* und *g/g'* (antiparallele Anordnung) können so intermolekulare elektrostatische Wechselwirkungen auftreten. Diese Wechselwirkungen sind vom pH-Wert und der Salzkonzentration der Lösung abhängig. Durch geschicktes Platzieren der geladenen Aminosäuren kann die relative Anordnung der Helices zueinander bestimmt werden und außerdem die Bildung eines  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Homo- oder Heterodimers erzwungen werden.<sup>[53-56]</sup> Die Positionen *b* und *c* sind dem Lösungsmittel ausgesetzt und demzufolge normalerweise mit hydrophilen Aminosäureresten besetzt. Zwischen den Positionen *b/e* und *c/g* können intramolekulare elektrostatische Wechselwirkungen auftreten. Attraktive Wechselwirkungen führen hier zu einer Stabilisierung der einzelnen Helixstränge.<sup>[57]</sup>

Position *f* liegt gegenüber der hydrophoben Wechselwirkungsdomäne und ist zum Lösungsmittel exponiert. Daher ist diese Position üblicherweise von hydrophilen Aminosäuren besetzt. Sie ist an keiner der drei Wechselwirkungsdomänen beteiligt und ein spezifisches Mitwirken an der Stabilisierung der *coiled coil*-Helix ist bisher nicht geklärt.

Außer den gerade beschriebenen kanonischen  $\alpha$ -helikalen *coiled coils* sind noch einige nicht kanonische  $\alpha$ -helikale *coiled coil*-Strukturen bekannt, welche nicht auf dem *Heptad*-Wiederholungsmuster basieren. Bei diesen sind die 3/4-Intervallabstände zwischen den hydrophoben Aminosäureresten erweitert oder verkürzt, was zu Deca- und Hendecamotiven führt. Diese nicht kanonischen  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Peptide bilden demzufolge nicht zwangsläufig linkshändige Superhelices aus.<sup>[58, 59]</sup>

### 3 ESTERSUBSTITUTIONEN IN $\alpha$ -HELIKALEN *COILED COIL*-PEPTIDEN

#### 3.1 *Angewandte Chemie Int. Ed.* 2007, 46(41), 7766-7769

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse wurden unter den folgenden Titeln im Original veröffentlicht:

- ◆ **J.A. Scheike, C. Baldauf, J. Spengler, F. Albericio, M.T. Pisabarro, B. Koks,**  
*Angewandte Chemie Int. Ed.* 2007, 46(41), 7766-7769.  
“Amide-to-ester substitution in coiled coils – The effect of removing hydrogen bonds on protein structure”
  
- ◆ **J.A. Scheike, C. Baldauf, J. Spengler, F. Albericio, M.T. Pisabarro, B. Koks,**  
*Angewandte Chemie* 2007, 119(41), 7912-7916.  
„Estersubstitutionen in  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Peptiden: Effekt der Eliminierung von Wasserstoffbrücken auf die Struktur von Proteinen“

Die Originalveröffentlichungen sind erhältlich unter:

<http://dx.doi.org/10.1002/anie.200702218>

<http://dx.doi.org/10.1002/ange.200702218>

Die hier abgedruckte Veröffentlichung wurde mit Genehmigung des Verlages reproduziert (Copyright © 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim).

#### **Erklärung:**

Eigenleistungen an diesen Veröffentlichungen sind: Konzeption der Versuche, Peptid-design, Peptidsynthese, CD-spektroskopische Untersuchungen, thermodynamische Analyse, Größenausschlusschromatographie, Manuskriptverfassung (mit Ausnahme der spezifischen Abschnitte der Kooperationspartner).

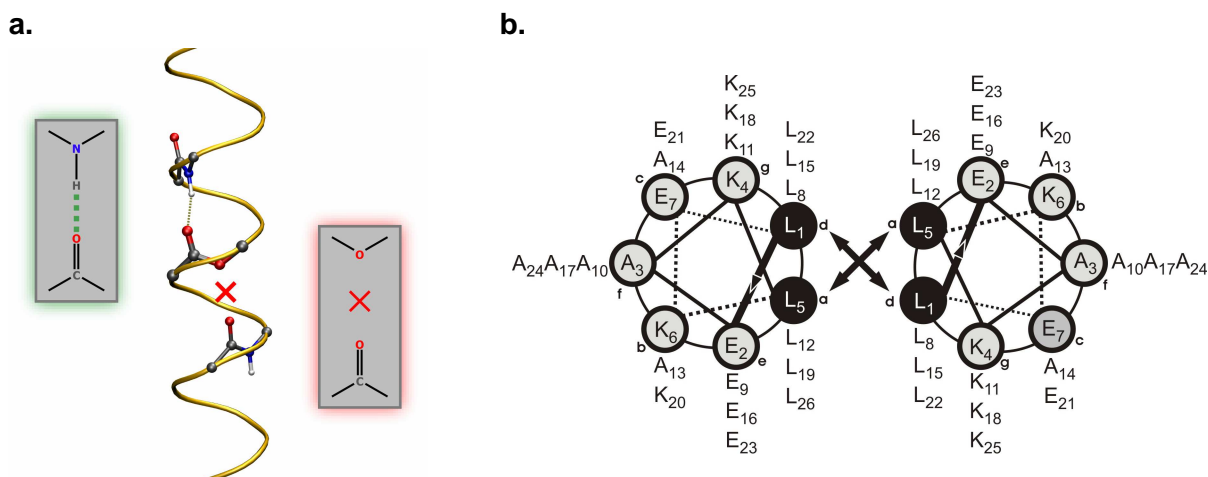
Folgende Kooperationen sind an den Veröffentlichungen beteiligt: Die MD-Simulationen wurden von Dr. Carsten Baldauf (Biotechnologiezentrum der TU Dresden) durchgeführt und

die Depsipeptide wurde von Dr. Jan Spengler (Institute for Research in Biomedicine, Barcelona Science Park, University of Barcelona) synthetisiert.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER VERÖFFENTLICHUNG:

#### „Estersubstitutionen in $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Peptiden: Effekt der Eliminierung von Wasserstoffbrücken auf die Struktur von Proteinen“

Für die Vorhersage von Struktur und Faltung von Proteinen ist die Klärung des Einflusses von Wasserstoffbrücken von entscheidender Bedeutung. Amid-zu-Ester-Substitutionen haben sich hierbei als nützliches Hilfsmittel erwiesen, um den Effekt der Wasserstoffbrücken im Peptidrückgrat auf die Strukturbildung und Stabilität von Peptiden und Proteinen zu untersuchen. In dieser Studie wurde die positionsabhängige Bedeutung einzelner Wasserstoffbrückenbindungen auf die Stabilität von *coiled coil*-Peptiden mittels eines kombinierten Ansatzes aus experimentellen Techniken und Moleküldynamik-Simulationen untersucht.



**Abbildung 8:** (a) Schematische Darstellung der intrahelikalen Wasserstoffbrückeneliminierung durch die Amid-zu-Ester-Substitution. (b) Helical-Wheel-Darstellung des untersuchten *coiled coil*-parent peptide. Durch die gezielte Substitution einzelner Aminosäuren mit den korrespondierenden  $\alpha$ -Hydroxysäuren wurden die Depsipeptid-Varianten  $L5\lambda$ ,  $A10\alpha$ ,  $K11\kappa$ ,  $L12\lambda$ ,  $A13\alpha$ ,  $L22\lambda$  und  $L12\lambda A13\alpha$  synthetisiert.

Hierfür wurden sechs Depsipeptidvarianten synthetisiert, bei denen systematisch eine bis zwei Amidbindungen durch Esterbindungen substituiert wurden. Die Substitutionen befanden sich sowohl in der hydrophoben Wechselwirkungsdomäne (Positionen a und d) als auch in den dem Lösungsmittel exponierten Positionen b, f und g. Zum einen wurde somit der

Einfluss der Solvatisierung auf die Stärke der intrahelikalen Wasserstoffbrücken untersucht. Zum anderen wurde gleichzeitig studiert, inwieweit Stabilitätsunterschiede zwischen einer *N*-terminalen und einer *C*-terminalen Wasserstoffbrückeneliminierung in der hydrophoben Wechselwirkungsdomäne bestehen. Die Konformation der verschiedenen Depsipeptide wurde mittels CD-Spektroskopie ermittelt und die Stabilitäten wurden durch GdnHCl-induzierte Denaturierung bestimmt. In Ergänzung wurden die Fragestellungen mittels Moleküldynamiksimulation untersucht.

Alle Peptid-Varianten mit nur einer Depsipeptidbindung zeigten eine  $\alpha$ -helikale *coiled coil*-Konformation. Die *N*-terminale Substitution in der hydrophoben Wechselwirkungsdomäne hat keinerlei Einfluss auf die Stabilität der *coiled coil*-Struktur. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die intramolekularen Wasserstoffbrücken in einer Helix zwischen dem Wasserstoffbrücken-Akzeptor in Position *i* und dem Wasserstoffbrücken-Donator in Position *i*+4 gebildet werden. Durch die Solvatisierung der terminalen Aminosäuren ist das Helixende allerdings flexibel und die *N*-terminale intramolekulare Wasserstoffbrücke wird daher kaum ausgebildet. Daher hat eine Estersubstitution in der Position 5 der Helix keinen Einfluss auf die *coiled coil*-Stabilität. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass eine einfache Substitution in der Mitte der hydrophoben Wechselwirkungsdomäne die größte Destabilisierung verursacht, da die eliminierte Wasserstoffbrücke sehr spezifisch ist. In dieser hydrophoben abgeschirmten Position ist nämlich die Ausbildung von alternativen Wasserstoffbrücken zwischen Aminosäure und Lösungsmittel nicht möglich. Durch die Konkurrenzsituation zwischen den intramolekularen Wasserstoffbrücken der Helix und den intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Peptidrückgrat und Lösungsmittelmolekülen ist die Destabilisierung bei einer Eliminierung von Wasserstoffbrücken in den solvatisierten Positionen *b*, *f* und *g* der *coiled coil*-Struktur nicht so gravierend. All diese Ergebnisse stehen in sehr guter Übereinstimmung mit den *in silico* durchgeführten Moleküldynamik-Simulationen.

Es wurde gezeigt, dass der Einfluss von Wasserstoffbrücken auf die Proteinfaltung in großem Maße von der jeweiligen Umgebung abhängt. Der Effekt resultiert hauptsächlich aus dem drastisch herabgesetzten Einfluss des Lösungsmittels in den hydrophoben, abgeschirmten Regionen der Peptide und Proteine.

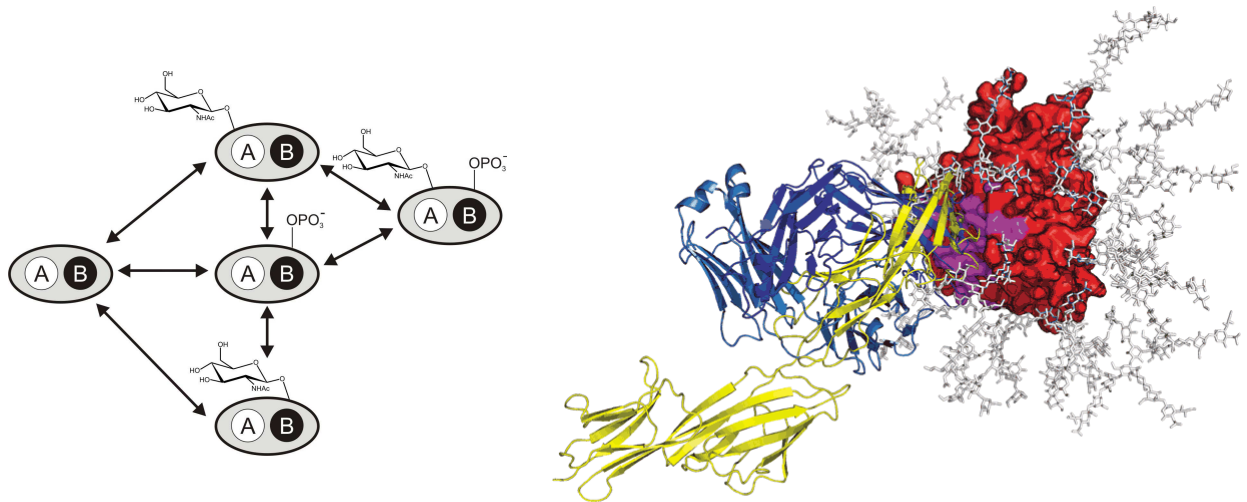
## TEIL 2

MULTIVALENTE COILED COIL-BASIERTE GLYKOPTIDE

## 4 GLYKOPROTEINE

Glykoproteine sind sowohl in Eukaryoten als auch Prokaryoten allgegenwärtig. Man findet sie auf der Membran von Zellen als auch in ihrem Inneren, sowohl im Cytoplasma als auch in den subzellulären Organellen.<sup>[60]</sup> Zudem findet man Glykoproteine in extrazellulären Flüssigkeiten wie dem Blutserum. Hier sind bis auf wenige Ausnahmen, wie z.B. dem Albumin, alle Proteine glykosyliert. Der Kohlenhydratanteil der Glykoproteine variiert stark von unter 1 % bis über 99 % wie z.B. in Glykogen. Ein und dieselbe Aminosäuresequenz kann sich allerdings in der Anzahl, der Position und der Struktur der gebundenen Glykaneinheiten unterscheiden. Diese Mikroheterogenität kommt dadurch zustande, dass der Aufbau der Oligosaccharidketten nicht wie die Proteinsynthese durch ein Templat codiert ist, sondern durch eine Vielzahl von Enzymen und Faktoren gesteuert wird. Es scheint so, dass unter konstanten physiologischen Bedingungen reproduzierbar dieselben Glykanpopulationen synthetisiert werden. Allerdings ist die Proteinglykosylierung sehr sensibel gegenüber Änderungen wie Zellwachstum und Zelldifferenzierung; und so sind abnormale Glykosylierungen mit einer Reihe von Krankheiten wie dem Muskelabbau,<sup>[61-63]</sup> Gelenkrheumatismus<sup>[64]</sup> und Krebs<sup>[65, 66]</sup> assoziiert. Außerdem können andere posttranslationale Modifizierungen wie die Phosphorylierung mit der *O*-Glykosylierung in Konkurrenz treten, da diese an denselben Aminosäureresten anknüpfen (siehe Abbildung 9 a).<sup>[67-69]</sup> So wird z.B. die resultierende Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins mit der neurodegenerativen Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht.<sup>[70, 71]</sup>

Glykoproteine sind an zahlreichen biologisch wichtigen Prozessen wie der Zellinteraktion, der Immunabwehr,<sup>[72-74]</sup> der viralen Replikation<sup>[75, 76]</sup> und Entzündungsprozessen<sup>[77, 78]</sup> im Körper beteiligt. Die Oligosaccharideinheiten der Glykoproteine können direkt an Zellinteraktionen partizipieren, aber sie können auch indirekt die Eigenschaften der Proteine wie deren Größe, Ladung, Löslichkeit, Stabilität oder Struktur beeinflussen.<sup>[79, 80]</sup> Wie in Abbildung 9 b am Beispiel des hyperglykosylierten HIV-1 gp120 zu erkennen ist, können selbst relativ kleine Oligosaccharideinheiten große Areale der Proteinoberfläche durch die Flexibilität der Aminosäureseitenkette bedecken und so das Protein vor Proteasen oder Antikörpern abschirmen.<sup>[81, 82]</sup>



**Abbildung 9:** (a) Dynamisches Zusammenspiel der O-Glykosylierung und der Phosphorylierung. O-GlcNAc und O-Phosphat konkurrieren um die selben Bindungsstellen A und B eines Proteins; Abbildung in Anlehnung an Comer et al.<sup>[69]</sup> (b) Abbildung des extensiv glykosylierten HIV-1 gp120 Oberflächenproteins (rot, mit weißen Glykanen) und des gebundenen Antikbods b12 (blau) sowie des CD4-Rezeptors (gelb); L. Kong, P.D. Kwong, J. Stuckey, T. Zhou / NIAID.

## 4.1 Glykosidische Bindungen

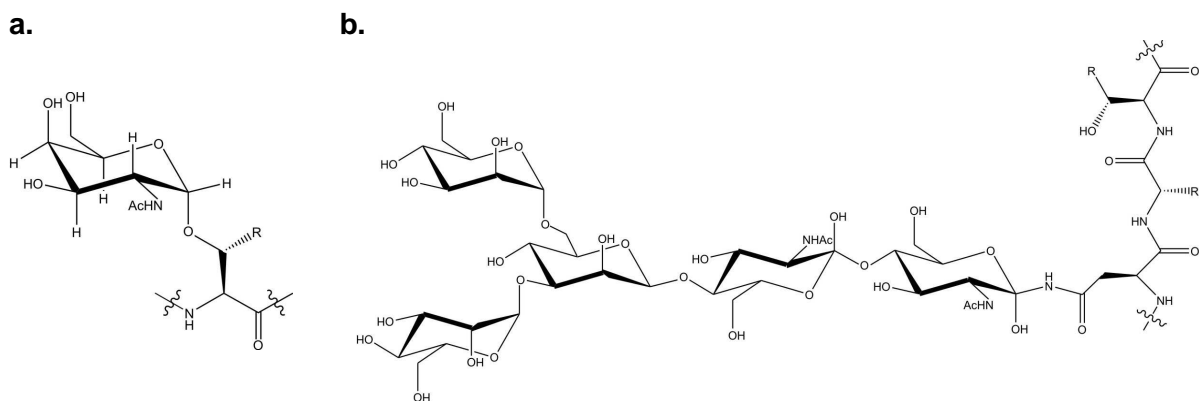
Im Wesentlichen kann man zwischen drei Proteinen-Kohlenhydrat-Bindungsarten unterscheiden:<sup>[60, 83]</sup>

1. Der O-glykosidischen Bindung zwischen dem endständigen Zucker und der Hydroxygruppe in einer Aminosäureseitenkette – meist Serin und Threonin aber auch Tyrosin, Hydroxyprolin oder Hydroxylysin.
2. Der N-glykosidischen Bindung zwischen dem Zucker und der Amidgruppe des Asparagins.
3. Der Bindung über Ethanolaminphosphat, welches die C-terminale Aminosäure eines Proteins mit einem Oligosaccharid des Glykosylphosphatidylinositol-Ankers (GPI-Ankers) verknüpft.

Des Weiteren sind noch eine Reihe weniger verbreiteter Protein-Kohlenhydrat-Bindungen wie z.B. C-glykosidische Bindungen<sup>[84, 85]</sup>, Phosphordiesterbrücken<sup>[86]</sup> und die Schiff'sche Basen bei der Bildung von *advanced glycation end products* (AGEs)<sup>[87]</sup> bekannt.

### 4.1.1 O-Glykosidische Bindung

Die O-Glykosylierung von Proteinen findet ausschließlich posttranslational statt. O-Glykane besitzen daher keine einheitliche Kernstruktur; vielmehr sind viele verschiedene Kernstrukturen bekannt. Im Gegensatz zu den N-Glykanen können auch Einfachzucker wie z.B. Fructose, N-Acetylglucosamin (GlcNAc) oder Galactose O-glykosidisch an das Peptid-rückgrat geknüpft sein.<sup>[83]</sup>



**Abbildung 10:** (a) Strukturformel des O-Glykans ( $\alpha$ GalNAc)Ser/Thr ( $R=H, CH_3$ ). (b) Strukturformel der pentameren Kernstruktur der N-Glykane mit der Erkennungssequenz Asn-Xaa-Ser/Thr ( $R=H, CH_3$ ).

### 4.1.2 N-Glykosidische Bindung

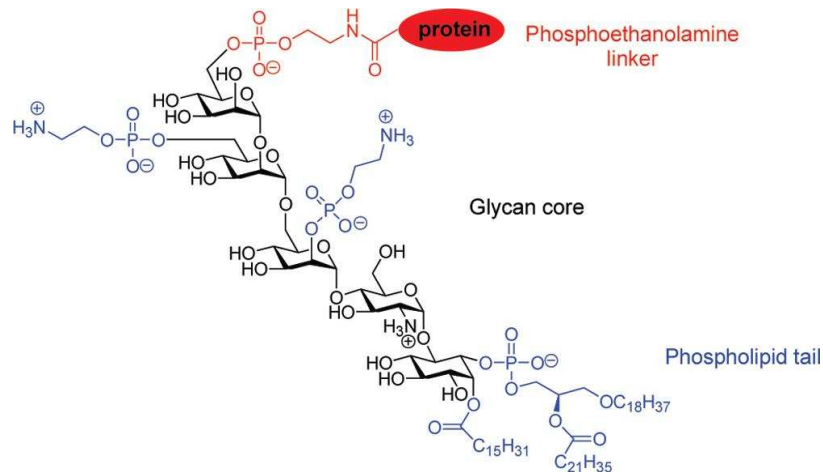
Im Gegensatz zur O-Glykosylierung wird das Asparagin nur dann glykosyliert, wenn es Teil der Erkennungssequenz Asn-X<sub>aa</sub>-Ser/Thr ist, wobei X<sub>aa</sub> jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann. Zu Beginn der Biosynthese von N-Glykoproteinen findet ein cotranslationaler Transfer des Dolicholdiphosphat-gebundenen Oligosaccharids Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> zum Asparagin der naszierenden Polypeptidkette statt gefolgt von einer Reihe von Saccharidabspaltungen. Daher besitzen alle N-glykosidisch verknüpften Glykane dieselbe pentamere Kernstruktur: Man $\alpha$ 1-6(Man $\alpha$ 1-3)Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc (siehe Abbildung 10 b).

### 4.1.3 Der GPI-Anker

Der Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) ist ein Glykolipid, welches posttranslational an den C-Terminus vieler eukaryotischer Proteine geknüpft ist. Eine Reihe von Oberflächenproteinen werden über den GPI-Anker in die Lipid-Doppelmembran von Zellen inseriert. Man kann die Struktur in drei Abschnitte unterteilen: In den Ethanolaminphosphat-Linker, die Glykan Kernstruktur und das Phospholipid (siehe Abbildung 11). Die



Glykankernstruktur kann durch Ethanolaminphosphate oder weitere Zucker modifiziert werden.



**Abbildung 11:** Struktur des GPI-Ankers der Acetylcholinesterase humaner Erythrozyten. Die drei Domänen des GPI-Ankers sind (i) der Ethanolaminphosphat-Linker (rot), (ii) die konservierte Glykan-Kernstruktur (schwarz), und (iii) der variable Phospholipidschwanz (blau); aus Paulick et al. <sup>[88]</sup> (Copyright © 2008 American Chemical Society).

## 4.2 Glykopeptidsynthese

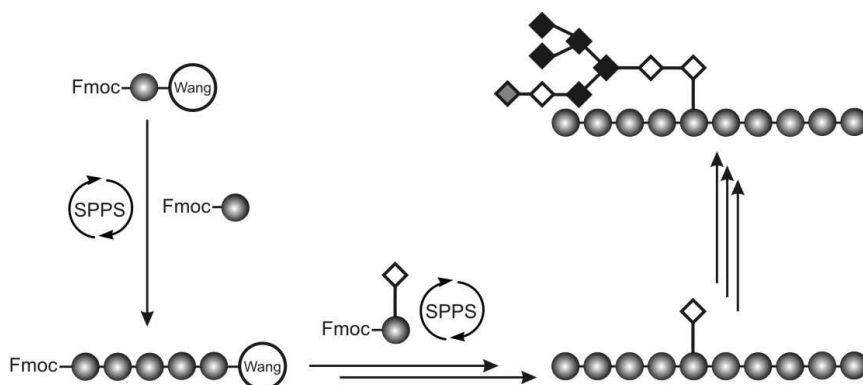
Im Gegensatz zur Aminosäuresequenz der Proteine ist das Glykosylierungsmuster nicht durch ein codierendes Templat vorgegeben. Vielmehr hängt das jeweilige Glykosylierungsmuster stark von dem jeweiligen Milieu und der Aktivität zahlreicher Glykosyltransferasen ab. Es steht aber außer Frage, dass man zum molekularen Verständnis der Struktur und Funktion von Glykoproteinen homogene Produkte benötigt. Die Trennung der verschiedenen Glykoformen ist allerdings selten möglich. Trotz der Komplexität der Glykoproteine hat sich die chemische Synthese und Semisynthese als wertvolles Hilfsmittel erwiesen, um an homogene Glykopeptide aber auch Glykoproteine zu gelangen. Die chemische Synthese hat gegenüber den reinen molekularbiologischen Methoden zudem den Vorteil, dass nach Bedarf Marker eingeführt werden können. Diese ermöglichen die Anwendung zahlreicher moderner spektroskopischer Methoden, die zur Aufklärung der Faltung und Funktion von Glykoproteinen beitragen. Es gibt zahlreiche Strategien zur Synthese von Glykopeptiden.<sup>[89-92]</sup> Der Übersicht halber soll hier eine Unterteilung in drei Abschnitte vorgenommen werden:

1. Glykopeptidsynthese mit Hilfe von vorhergehend synthetisierten Glykosyl-Aminosäure-Bausteinen, die so genannte *building-block*-Strategie.
2. Glykopeptidsynthese an der Festphase.
3. Glykopeptidsynthese in Lösung.

Erst diese aufeinander aufbauenden Strategien erlauben durch geschickte Kombination die Synthese von komplexen Glykopeptiden und zum Teil selbst Glykoproteinen.

#### 4.2.1 Die *building-block*-Strategie

Bei der *building-block*-Strategie werden zunächst einzelne Glykosyl-Aminosäure-Bausteine synthetisiert, die anschließend in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden können (siehe Abbildung 12). Bei *N*-Glykosiden wird meist ein Glykosylamin eingesetzt, welches mit der geschützten Asparaginsäure umgesetzt wird.<sup>[93]</sup> Sie sind aber auch durch andere Strategien wie z.B. der stereoselektiven *N*-Glykosylierung mittels Staudinger Ligation aus Glykosyl-Aziden zugänglich.<sup>[94]</sup> *O*-Glykoside erhält man durch die Umsetzung von Glykosyl-Halogeniden mit den in der Seitenkette ungeschützten Aminosäuren Serin und Threonin. Die  $\alpha$ -Selektivität kann über eine 2-Azido-Gruppe am Zucker gesteuert werden.<sup>[95]</sup>  $\beta$ -Selektivität erhält man hingegen durch den Nachbargruppeneffekt von Glykosyl-Donoren wie Acetat- bzw. Acetatamidogruppen.<sup>[96]</sup> Komplexere Glykoside können aber auch mittels orthogonaler Schutzgruppenstrategien aufgebaut werden, indem schrittweise weitere Glykane an einen Glykosyl-Aminosäure-Akzeptor geknüpft werden.



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der *building-block*-Strategie. Ein Glykosyl-Aminosäure-Baustein wird mittels Festphasenpeptidsynthese in die Peptidkette eingebaut. Dem Glykan können anschließend weitere Saccharideinheiten hinzugefügt werden.

### 4.2.2 Glykopeptidsynthese an der Festphase

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese ist die Methode der Wahl um Peptide zu synthetisieren.<sup>[97-99]</sup> Durch den Einsatz von Glykosyl-Aminosäure-Bausteinen lassen sich Glykopeptide analog zur konventionellen Peptidsynthese darstellen. Aufgrund der Säurelabilität vieler Zucker hat sich hier die milde Fmoc-Schutzgruppenstrategie bewährt. Meist kann das Standard-Syntheseprotokoll verwendet werden und nur am Ende nach der simultanen Abspaltung der Aminosäure-Seitenkettenschutzgruppen und des Trägerharzes ein zusätzlicher Schritt zur Abspaltung der Zuckerschutzgruppen hinzugefügt werden. Die Hydroxygruppen des Zuckers werden für die Peptidsynthese üblicherweise als Acetat oder Benzylether geschützt, können aber teilweise auch ungeschützt bleiben.<sup>[100]</sup> Die *O*-Acetylierung hat zudem den Vorteil, dass diese die *O*-glykosidische Bindung gegenüber elektrophilen Angriffen schützt. Die Festphasenpeptidsynthese kommt natürlich auch bei der Synthese von Peptidfragmenten für die Peptid-Ligation (siehe Abschnitt 4.2.3) zum Einsatz.

### 4.2.3 Glykopeptidsynthese in Lösung

Die so genannte *block*-Strategie erlaubt es bei der Synthese von *N*-Glykopeptiden das vollständige Oligosaccharid in Lösung direkt an die Seitenkette der Asparaginsäure zu koppeln (siehe Abbildung 13 a). Die Seitenkettenfunktion der Asparaginsäure wird für die Kupplung des Glykosylamins typischer Weise mit HBTU / HOBt / DIEA / DMSO oder HATU / DIEA / DMSO aktiviert.<sup>[101, 102]</sup> Bei der *O*-Glykosylierung wird die *building-block*-Strategie meist vorgezogen, da die *block*-Strategie schlechte  $\alpha/\beta$ -Selektivitäten und Ausbeuten liefert.

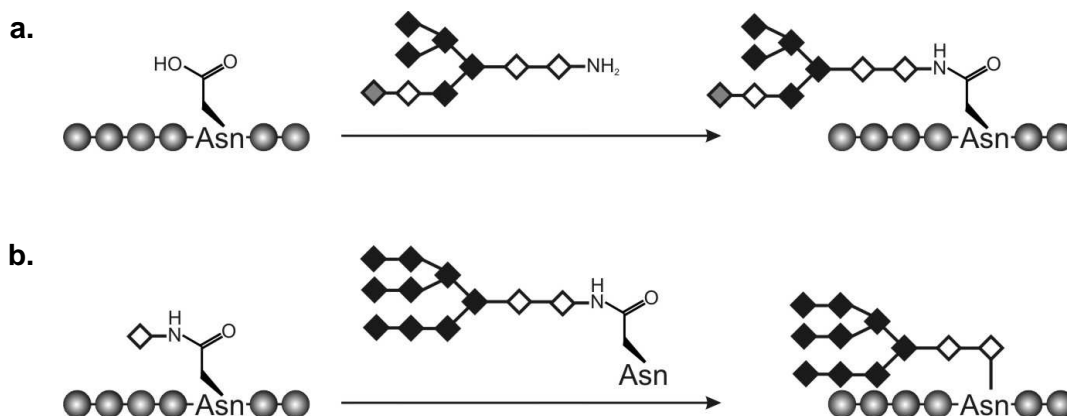
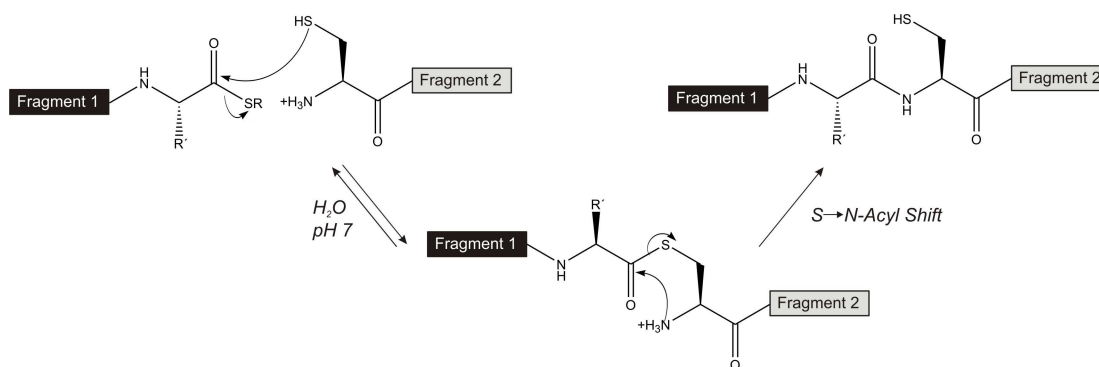


Abbildung 13: Schematische Darstellung der *block*-Strategie (a) und der *trans*-Glykosylierungs-Strategie (b).

Im Anschluss an die Synthese des Glykosyl-Aminosäure-Bausteins und der Festphasen-peptidsynthese ist es mittels enzymatischer Synthese möglich komplexe Kohlenhydratstrukturen einzuführen.<sup>[103]</sup> In Analogie zum biosynthetischen Weg können *O*-glykosidisch verknüpfte Kohlenhydratstrukturen schrittweise mit der Hilfe von Glykosyltransferasen und Zuckernukleotiden aufgebaut werden.<sup>[104-107]</sup> Es ist aber auch die komplett enzymatische Glykopeptidsynthese möglich, bei der vom unglykosylierten Peptid ausgegangen wird.<sup>[108]</sup> Des Weiteren kann die Glykosidase in der trans-Glykosylierungs-Strategie dazu eingesetzt werden, um zwei Asparaginsäure gebundene GlcNAc-Reste miteinander zu verknüpfen. So können in einem Schritt komplexe Glykane mittels einer Glykosyl-Asparaginsäure als Donor in ein Glykopeptid eingeführt werden (siehe Abbildung 13 b).<sup>[109-111]</sup>

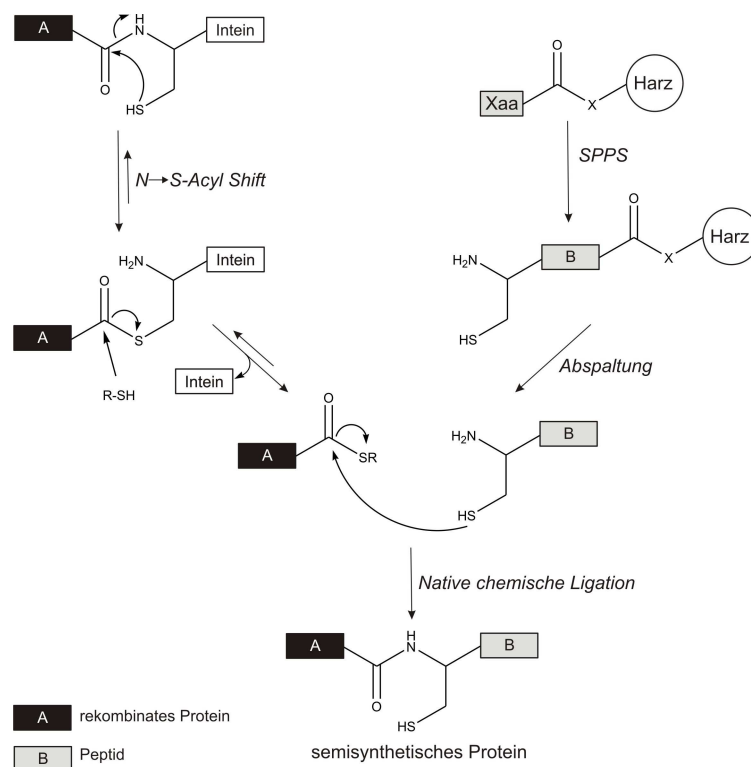


**Abbildung 14:** Native chemische Ligation: chemeoselektive Ligation von zwei ungeschützten Peptidfragmenten. Der erste Schritt ist reversibel, wohin gegen der nukleophile intramolekulare Angriff irreversibel ist.

Bei längeren Glykopeptiden bietet sich die Peptidligation an, da bei langen Sequenzen die Anteile an abgebrochenen Peptidsequenzen und Epimerisierungen dramatisch zunimmt und die Ausbeute und Reinheit des Produktes in Folge dessen stark abnimmt.<sup>[92, 112, 113]</sup> Enzyme können nicht nur zum Aufbau des Kohlenhydratbaumes genutzt werden, sondern auch die Ligation von Glykopeptidfragmenten katalysieren. Der Vorteil hierbei ist, dass die enzymatische Ligation stereospezifisch verläuft und die Glykopeptidfragmente zudem ungeschützt eingesetzt werden können, was für eine gute Löslichkeit während der Ligation sorgt.<sup>[112, 114-116]</sup> Eine andere Möglichkeit, die ungeschützten Glykopeptidfragmente chemeoselektiv zu verknüpfen, ist die native chemische Ligation.<sup>[117, 118]</sup> Hierbei reagiert ein C-terminaler Thioester des einen Fragments mit dem N-terminalen Cystein des zweiten Peptidfragments (siehe Abbildung 14). Die Fortschritte in der Forschung der letzten Jahre erlauben heute auch die Cystein-freie native chemische Ligation und erweitern so die

Anwendbarkeit dieser chemeoselektiven Ligationstechnik auf viele biologisch relevante Sequenzen.<sup>[119-124]</sup> Besonders hervorzuheben ist hierbei die so genannte *sugar-assisted ligation* (SAL), welche den Zugang zu Cystein freien  $\alpha$ - und  $\beta$ -O-glykosylierten und N-glykosylierten Peptiden ermöglicht.<sup>[125-127]</sup>

Durch die *expressed protein ligation* (EPL),<sup>[128]</sup> einem semisynthetischen Ansatz aus Expression rekombinanter Proteinfragmente und anschließender Ligation mit einem Glykopeptid, ist selbst der Zugang zu Glykoproteinen möglich (siehe Abbildung 15).<sup>[129-131]</sup> Nicht unerwähnt bleiben soll hier die theoretisch mögliche Zugänglichkeit von Glykopeptiden durch die Erweiterung des Genetischen Codes mittels der *in vivo Suppressor tRNA Technology*,<sup>[132-134]</sup> auch wenn die bisherigen Experimente nicht reproduziert werden konnten.<sup>[135, 136]</sup>



**Abbildung 15:** Prinzip der *expressed protein ligation* (EPL). Die EPL ist eine semisynthetische Methode bei der ein rekombinantes Protein (A) mit einem chemisch synthetisiertem Peptid ligiert wird. Das Protein wird als Inteininfusionsprotein exprimiert. Das Intein kann mit zahlreichen Thiolen abgespalten werden, sodass man den korrespondierenden Thioester erhält. Das Peptidfragment (B) kann an der Festphase mit Hilfe eines geeigneten Linkers (X) synthetisiert werden.

## 5 MULTIVALENZ

### 5.1 Multivalente Protein-Kohlenhydrat Wechselwirkungen

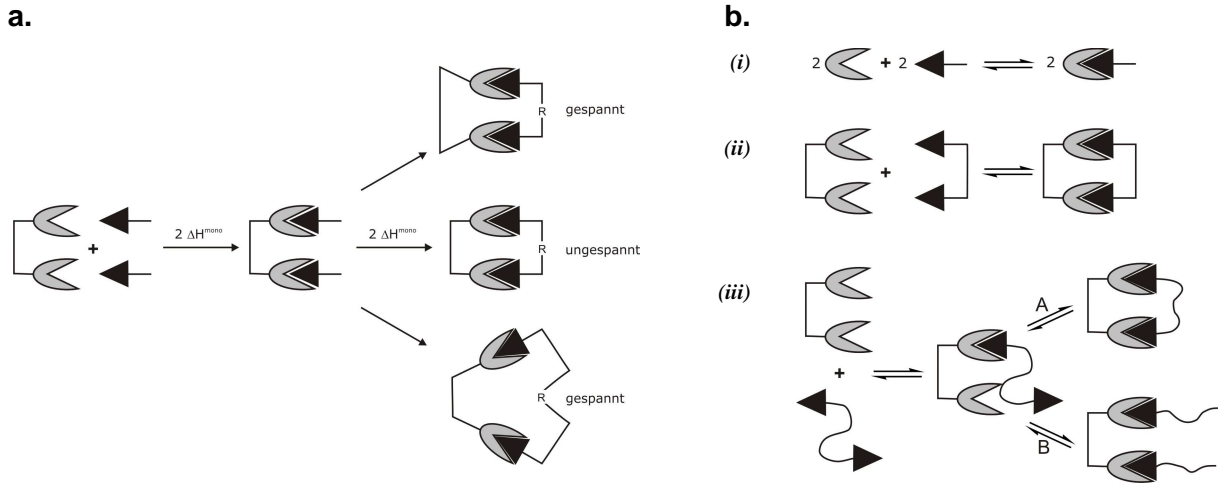
Schwache multivalente Protein-Kohlenhydrat Wechselwirkungen sind an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt. So wird unter anderem auch die Wirtserkennung einer Reihe von Bakterien, Viren und Parasiten am Anfang des Infektionszyklus, über Zucker vermittelt. Eine umfassende Übersicht mit Beispielen ist im Review von Whitesides *et al.* zu finden.<sup>[137]</sup> Die Bindungsstellen der Rezeptorproteine sind meist sehr flach und größtenteils dem Lösungsmittel exponiert.<sup>[138, 139]</sup> Daher werden monovalente Liganden meist relativ unselektiv und mit geringer Affinität gebunden. Die Natur scheint dieses Spezifitäts- und Affinitätsproblem der individuellen Ligand-Rezeptor Bindung durch kooperative multivalente Wechselwirkungen einer Vielzahl von räumlich passend zueinander angeordneten Ligand-Rezeptor-Paaren zu umgehen.<sup>[140]</sup> Bei der Entwicklung neuer Therapeutika ist es daher sehr schwierig, kleine selektive Inhibitormoleküle zu finden, die die Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen unterbinden. Daher richtet sich das Augenmerk der Wissenschaft immer mehr auf multivalente Gerüste auf der Strukturbasis von Dendrimeren, Nanopartikeln, Polymeren oder Peptid- und Acrylamidrückgratstrukturen.<sup>[141]</sup> Nach einem kurzen Einblick in die Thermodynamik multivalenter Prozesse wird im Folgenden der Schwerpunkt auf die Beschreibung von Peptidrückgrat-basierten Gerüststrukturen gelegt.

### 5.2 Thermodynamik multivalenter Wechselwirkungen

Für ein erfolgreiches Design von neuen multivalenten Liganden ist es wichtig, einige thermodynamische Aspekte zu berücksichtigen. Im Folgenden werden zwei Aspekte – der Abstand zwischen den Liganden und die Flexibilität des Spacers – diskutiert, um dann auf die allgemeine thermodynamische Beschreibung von multivalenten Wechselwirkungen zu kommen.

Multivalente Wechselwirkungen sind komplexe miteinander verwobene Prozesse. So kann eine enthalpische Bindungsschwächung auftreten, wenn, wie in Abbildung 16 a gezeigt, Rezeptormolekül und Liganden geometrisch nicht ideal zusammenpassen. Vor allem bei starren Gerüststrukturen mit zu geringen Abständen zwischen den Liganden kommt es aufgrund der energetisch ungünstigeren gespannten Konformationen zu einer Bindungs-

schwächung. Der Einfluss der Flexibilität des Spacers wird allerdings kontrovers diskutiert.<sup>[142]</sup> Auf der einen Seite wird argumentiert, dass sich ein flexibler Spacer besser an den Rezeptor anpassen kann und so kleine Abweichungen zwischen Liganden- und Rezeptorbindungsabständen ohne den Aufwand einer allzu hohen Spannungsenergie ausgeglichen werden können. Andererseits können zu flexible Spacer zwischen den Liganden aus entropischer Sicht hinderlich sein, da eine hohe Konformationsentropie für die Bindung an den Rezeptor aufgewendet werden muss. Hat der Spacer nach der Bindung mit dem ersten Rezeptor allerdings diesen negativen entropischen Beitrag erbracht, kann der zweite Ligand ohne translationale oder rotationale entropische Aufwendungen binden, da er sich schon so in der Nähe des Rezeptors befindet.



**Abbildung 16:** (a) Schema zur Bindungsenthalpie: Die Bindungsenthalpie des bivalenten Liganden ist dem der monovalenten Liganden gleich, wenn der starre Spacer genau den Rezeptorabstand überbrückt. Ist der Spacer allerdings zu kurz oder zu lang, kommt es aufgrund der aufzuwendenden Spannungsenergie zu einer enthalpischen Bindungsschwächung. (b) Schema zur Bindungsentropie: (i) Bezugssystem bestehend aus zwei Liganden und zwei Rezeptoren; (ii) maximale entropische Verstärkung durch einen starren bivalenten Spacer der die Liganden im idealen Rezeptorabstand präsentiert; (iii) mit einem flexiblen bivalenten Spacer ist Weg A entropisch verstärkt und Weg B entropisch geschwächt. Abbildung in Anlehnung an Mammen et al..<sup>[137]</sup>

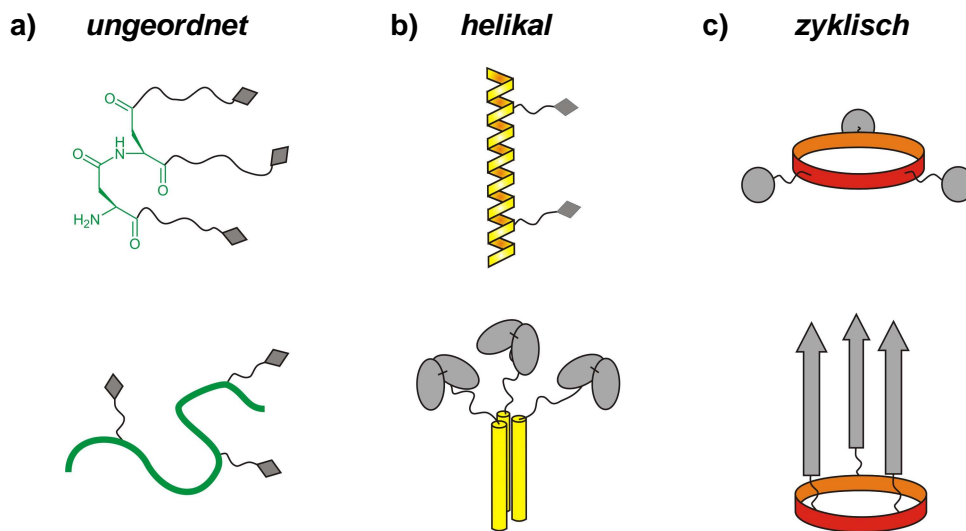
Die Freie Energie der Bindung  $\Delta G_N^0(i)$  eines multivalenten Moleküls mit  $N$  Liganden als Funktion der Anzahl von Liganden  $i$ , die an einen multivalenten Rezeptor binden ( $0 \leq i \leq N$ ), lässt sich durch folgende Gleichung beschreiben:<sup>[143]</sup>

$$\Delta G_N^0(i) = i\Delta H_{affinity}^0 - iT\Delta S_{affinity}^0 + (i-1)T\Delta S_{trans+rot}^0 + (i-1)\Delta H_{linker}^0 - (i-1)T\Delta S_{conf}^0 + (i-1)\Delta G_{coop}^0 - RT \ln(\Omega_i / \Omega_0)$$

G- 2

Dabei sind  $\Delta H^0_{affinity}$  und  $\Delta S^0_{affinity}$  die monovalente Enthalpie bzw. Entropie der Bindung. Die Summe dieser beiden ersten Terme ( $i\Delta H^0_{affinity} + iT\Delta S^0_{affinity}$ ) würde die Freie Bindungsenergie liefern, falls die  $i$  Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen unabhängig voneinander stattfinden würden. Der dritte Term berücksichtigt die translationale und rotationale Entropie, basierend auf der Annahme, dass diese für monovalente und multivalente Wechselwirkungen ähnlich sind.  $\Delta H^0_{Spacer}$  gibt die Enthalpieänderung an, die aus Wechselwirkungen des Spacers mit dem Rezeptor resultiert. Außerdem wird der Verlust der Konformationsentropie  $\Delta S^0_{conf}$  des Spacers nach der Bindung mit den Rezeptoren berücksichtigt. Zuletzt wird noch die Kooperativität  $\Delta G^0_{coop}$  des Prozesses berücksichtigt und ein statistischer Faktor eingeführt, wobei  $\Omega_i$  die Degeneration eines Komplexes beschreibt, bei dem  $i$  Liganden an den Rezeptor gebunden sind.

### 5.3 Multivalente Peptidrückgrat basierte Gerüststrukturen



**Abbildung 17:** Schema der diversen multivalenten Gerüststrukturen. (a) Ungeordnete Gerüststrukturen: kleines trivalentes Gerüst  $\beta$ -DD mit Glykosylliganden (oben); lineare Peptidkette mit Seitenkettenverknüpfungen (unten). (b) Helikale Gerüststrukturen:  $\alpha$ -Helix mit Glykosylliganden (oben); trivalente Collagen-basierte Gerüststruktur mit drei *scFv*-Liganden (unten). (c) Zyklische Gerüststrukturen: Radiale Anordnung der Liganden (oben); axiale Anordnung von Liganden wie z.B.  $\beta$ -Faltblättern (unten).

Im Folgenden wird ein systematischer Überblick über die verschiedenen Peptid-basierten multivalenten Rückgratstrukturen anhand einiger ausgewählter Beispiele präsentiert. Ziel ist es dabei nicht, eine allumfassende Auflistung aller bisher synthetisierten multivalenten



Gerüste zu liefern, sondern viel mehr die geometrischen Möglichkeiten und Unterschiede herauszuarbeiten.

### 5.3.1 Ungeordnete Gerüststrukturen

Unter den Begriff multivalente ungeordnete Peptid-basierte Gerüststrukturen fallen eine Reihe von sehr unterschiedlichen Verbindungen. Sie bestehen im Extremfall aus nur einer Aminosäure oder auch aus mehreren hundert Aminosäuren und sind bivalent oder können mehrere hundert Liganden tragen.

Als kleinste multivalente Gerüststruktur kann man einzelne Aminosäuren verwenden. So können z.B. zwei Liganden über die beiden Carboxygruppen der Asparaginsäure kovalent miteinander verknüpfen werden. Lee und Mitarbeiter entwickelten basierend auf  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-Glutaminsäure ( $\gamma$ -EE) bzw.  $\beta$ -L-Aspartyl-L-Asparaginsäure ( $\beta$ -DD) trivalente Inhibitoren für den Asiaglycoproteinrezeptor (ASGP-R).<sup>[144, 145]</sup> Hierbei wurden die GalNAc-Liganden über hydrophobe Aminoheptyllinker an den drei Carboxygruppen der Glutamin- bzw. Asparaginsäure eingeführt (siehe Abbildung 17 a oben). Ende der Achtzigerjahre entwickelten Tam *et al.* basierend auf der Verzweigung von Lysinreste so genannte MAPs (*multiple-antigen peptide*).<sup>[146, 147]</sup> Diesem Konzept folgend wurden seitdem eine Reihe von multivalenten Peptid- und Glykopeptid-Dendrimeren synthetisiert und untersucht.<sup>[148-150]</sup> Im Folgenden wird nicht weiter auf diese Peptid-basierten Dendrimere eingegangen, sondern der Fokus auf die Beschreibung linearer multivalenter Peptidrückgratstrukturen gelegt.

Multivalente homopolymere lineare Peptidketten sind in ihrer Anwendung viel verbreiteter als die eben beschriebenen kleinen Gerüste. Hierbei werden mehrere Liganden über die funktionellen Aminosäureseitenketten statistisch verteilt in die Peptidkette eingeführt. Am gebräuchlichsten ist hierbei die Poly-L-Glutaminsäure (PGA), über deren Carboxyseitenketten die Liganden über den chemischen Weg oder über einen mit enzymatischen Techniken kombinierten Ansatz eingeführt werden können. Durch die Länge der linearen polymeren Grundgerüststruktur können auch weite Rezeptorabstände überbrückt werden. Zudem erlaubt die flexible Struktur eine relativ spannungsfreie Interaktion der Liganden mit den Rezeptoren. Weitere Vorteile dieses Gerüsts sind die niedrige Toxizität und Immunogenität sowie die Bioabbaubarkeit und gute Wasserlöslichkeit (10% w/v) der PGA. So haben sich z.B. hochpolymere Lysogangliosid/Poly-L-glutaminsäure-Konjugate (PGA Polymerisierungsgrad 540;

Lysogangliosid GM<sub>3</sub> Gehalt 0,72 mol%) als pikomolare Inhibitoren des trimeren Hämagglutinin des Influenza-Virus erwiesen.<sup>[151]</sup> Eine weitere Studie hat gezeigt, dass die Inhibierung von Influenza-Viren durch PGA gebundene Sialyloligosaccharid-Liganden (Polymerisierungsgrad 95-475) zum einen vom Molekulargewicht der Poly-L-glutaminsäure, aber auch vom Sialinsäure Gehalt abhängt.<sup>[152]</sup> Kiick und Mitarbeiter haben an PGA-basierten Cholera-Toxin-Inhibitoren jedoch auch zeigen können, dass sich eine zu hohe Dichte des  $\beta$ -D-Galactosamin-Liganden negativ auf die Inhibierung auswirken kann.<sup>[153]</sup> Die Ursache liegt vermutlich in sterisch erschweren Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen, wenn mehr Liganden präsentiert werden als es die Rezeptorabstände erfordern (35 Å im Beispiel der Cholera-Toxin B<sub>5</sub>-Untereinheit). Die Einführung von Aminohexyllinkern zwischen dem PGA-Rückgrat und den  $\beta$ -D-Galactosamin-Liganden hat hingegen auch hier einen positiven Einfluss auf die Inhibierung, da diese hydrophoben Linker zu einer verbesserten Zugänglichkeit der terminalen Glykoside in die Rezeptorbindungstaschen beitragen. In weiteren Studien wurde gezeigt, dass PGA-basierte Glykopeptide selektiv an zahlreiche pflanzliche Lektine binden.<sup>[154-156]</sup> Das Glykosylierte PGA-Rückgrat eignet sich daher als Modellsystem für Glycane vom Mucin-Typ. Zudem konnte hier auch gezeigt werden, dass die Glykopeptide spezifisch mit dem jeweilig korrespondierenden Lektin interagieren, und zwar unabhängig davon, um wie viele Zuckerreste das Glykan im Vergleich zum natürlichen Glykoprotein gekürzt wurde.<sup>[156]</sup>

Anstelle von homopolymeren Peptidketten können aber auch Aminosäuren mit unreaktiven Seitengruppen wie z.B. Glycin oder Alanin als so genannte Abstandshalter zwischen den funktionalisierten Aminosäuren dienen. Auf diese Weise kann zum einen der Abstand zwischen den Liganden kontrolliert werden, aber auch die Sekundärstruktur des Peptids beeinflusst werden. Ein solches System ist daher hervorragend dazu geeignet, den Einfluss von Ligandenabständen auf die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zu untersuchen. Unverzagt *et al.* synthetisierten z.B. eine Reihe von bivalenten Modellpeptiden als Inhibitoren für das Influenza-Virus.<sup>[157]</sup> Dabei wurden die mit der Aminosäure Asparagin verknüpften Sialyl-*N*-acetyllactosamin-Liganden durch flexible Glycin-reiche Abstandshalter unterschiedlicher Kettenlänge miteinander verbunden.

Ein weiterer strategischer Ansatz nutzt repetitive Peptidsequenzen, um die Liganden in gleichmäßigen Abständen auf dem linearen Peptidrückgrat zu präsentieren. Über geeignete

Seitenkettenfunktionen der Aminosäuren ist es auf diese Art und Weise möglich, die Liganden in definierten Abständen in das Peptidrückgrat einzuführen. Davis *et al.* zeigte, dass sich repetitive Sequenzen des Typs **GKGAGKGS**, **GKGTGA** und **GKAGTGSA** dazu eignen, alle 4, 6 bzw. 8 Aminosäuren verschiedenste Liganden (Peptid, Peptoid-Peptid-Hybrid, PEG-Polymer, organisches Fluorophor) über Lysinseitenketten einzubauen.<sup>[158]</sup> Auf analoge Weise wurden Gadolinium(III)-Chelatoren über die  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysinreste in ein 264 Aminosäuren langes Protein mit der repetitiven Sequenz **(GKAGTGSA)<sub>30</sub>** eingebaut.<sup>[159]</sup> Dieses multivalente Kontrastmittel für die Kernspinresonanztomographie hat gegenüber dem monovalenten System verbesserte Eigenschaften und bietet einem zudem die Möglichkeit, es über die freien Lysinreste mit Hydrogelen quervernetzen. Kiick und Mitarbeiter nutzten neben ihren PGA-basierten Cholera-Toxin-Inhibitoren auch Glycin- und Alanin-reiche repetitive Peptidsequenzen.<sup>[160]</sup> Die Glykosylliganden wurden hier gezielt in unterschiedlichen Abständen über die Carboxygruppen von Glutamatresten eingeführt. Sie konnten zeigen, dass die Ligandenabstände des effektivsten Inhibitors mit den Rezeptorabständen des Cholera-Toxins von 35 Å übereinstimmen.

### 5.3.2 Helikale Gerüststrukturen

In Analogie zu den oben beschriebenen Strategien können neben den ungeordneten auch helikale multivalente Peptidrückgratstrukturen aufgebaut werden, indem die Polypeptidketten diesmal überwiegend aus Aminosäuren wie Alanin oder Prolin aufgebaut werden, welche eine starke Neigung zur  $\alpha$ -Helix- bzw. Poly-Prolin-Helix-Bildung haben. Im Vergleich zu den ungeordneten Strukturen sind die helikalen Strukturen wesentlich steifer. Das hat zur Folge, dass die Ligandenabstände entlang der Helixachse genau an die Rezeptorabstände angepasst werden müssen. Gleichzeitig wird aber durch das rigide Peptidrückgrat auch ein all zu großer Entropieverlust bei der Ligand-Rezeptor-Bindung minimiert.

Neben den Glycin-reichen ungeordneten bivalenten Peptiden testeten Unverzagt *et al.* auch bivalente Prolin-reiche Influenza-Inhiobitoren.<sup>[157]</sup> Diese zeigten in Abhängigkeit von der Länge der Prolinkette zwischen den Liganden teilweise eine verbesserte aber zum Teil auch eine schlechtere Inhibierung im Vergleich zum monovalenten System. Die in diesem Fall ungünstige Platzierung der Liganden entlang der steifen Prolinhelix verhindert offenbar die gleichzeitige Bindung beider Liganden und resultiert so in einer schlechteren Inhibierung. Kiick und Mitarbeiter nutzten nicht die Prolinhelix, sondern eine Alanin-reiche Sequenz als

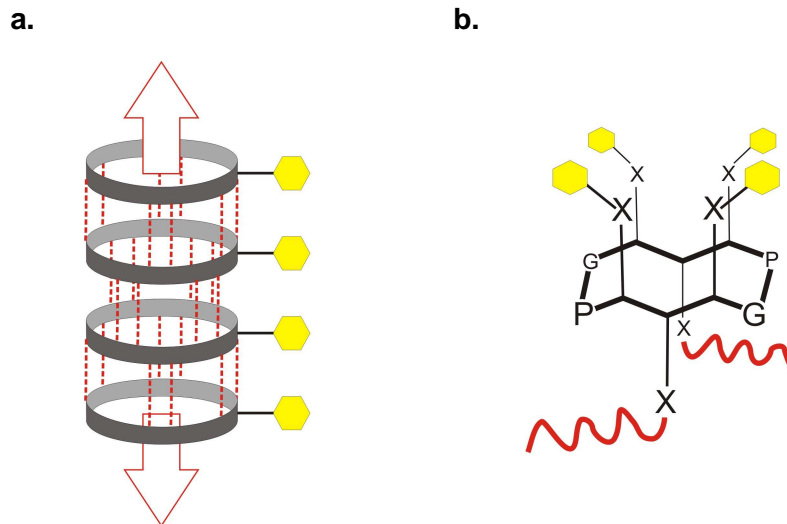
$\alpha$ -helikale Gerüststruktur für Cholera-Toxin-Inhibitoren.<sup>[161]</sup> In diese wurden die mit einem Aminohexyllinkern verknüpften Glykosylliganden in spezifischen Abständen über die Glutamatseitenketten des Peptidrückgrats eingeführt. Die Versuche zeigten, dass es zu einer deutlich verbesserten Inhibierung kommt, wenn die Liganden- und Rezeptorenabstände übereinstimmen. Im Vergleich zum analogen ungeordneten multivalenten Inhibitor Cap-35-RC-6<sup>[160]</sup> zeigte der  $\alpha$ -helikale Inhibitor Cap 35-H-6 noch einmal eine um den Faktor zwei verbesserte Inhibierung (162-fach Cap 35-RC-6; 340-fach Cap 35-H-6 im Vergleich zum monovalenten Liganden), was vermutlich auf den geringeren Verlust der Konformationsentropie zurückzuführen ist.

Eine andere Strategie bedient sich der selbstassoziierenden Collagen-Tripelhelix-Struktur, um terminal gebundene Liganden in räumlicher Nähe zueinander zu präsentieren. Bei den so genannten *Trimerbodies*<sup>[162, 163]</sup> bzw. *Collabodies*<sup>[164]</sup> wurden scFv-Antikörper über terminale Linker in eine Collagen-Tripelhelix eingeführt (siehe Abbildung 17 b unten). Cuesta *et al.* nutzten eine mit drei scFv-Antikörpern funktionalisierte Untereinheit vom Collagen XVII NC1 zum Tumor-Targeting.<sup>[162]</sup> Die L36 scFv-Antikörper wurden hierbei N-terminal über 21 Aminosäuren lange flexible Linker mit der Collagen Tripelhelix verknüpft. Diese *Trimerbodies* zeigten mindestens eine 100-fach höhere Affinität im Vergleich zu dem korrespondierenden monovalenten Antikörper. Sie konnten zudem zeigen, dass es möglich ist, bifunktionelle *Trimerbodies* zu generieren (anti-Laminin  $\times$  anti-NIP). Fan *et al.* nutzten kein natürliches Collagenfragment, sondern exprimierten ein kurzes Collagen-ähnliches Peptid mit der repetitiven Sequenz (Gly-Pro-Pro)<sub>10</sub> (die Prolinreste wurden größtenteils hydroxyliert). Die scFv-Antikörper wurden entweder mit dem N- oder mit dem C-Terminus des Collagen-ähnlichen Peptids verknüpft. Diese so genannten *Collabodies* zeigten eine ~20 – 1000-fach höhere Bindungsstärke im Vergleich zu dem bivalenten bzw. monovalenten System.

### 5.3.3 Zyklische Gerüststrukturen

Zyklische Peptidrückgratstrukturen eignen sich hervorragend, um eine begrenzte Anzahl von Liganden zu präsentieren. Hierbei muss man grundsätzlich zwei Arten von zyklischen Systemen unterscheiden: Zum einen jene, welche die Liganden radial zur Ringebene präsentieren und zum anderen jene, bei denen die Liganden axial angeordnet sind. Zyklische Gerüststrukturen bieten den Vorteil, dass sowohl die Anzahl aber auch die Abstände zwischen

den Liganden kontrollierbar sind. Des Weiteren ist das Gerüst rigide genug, um die Orientierung der Liganden vorzugeben, aber es ist dennoch möglich, über flexible Linker große Moleküle wie Proteine einzuführen.



**Abbildung 18:** Schematische Darstellungen der multivalenten zyklischen Peptidgerüststrukturen: (a) Selbst assoziierende zyklische Peptide mit jeweils einem radial orientierten Liganden (gelb); intermolekulare Wasserstoffbrücken (rot gestrichelt). (b) multivalentes RAFT-basiertes Cyclopeptid mit zwei verschiedenen Ligandentypen (gelb und rot). X sind die Aminosäureseitenkettenreste bzw. die funktionellen Analoga, die zur Einführung der Liganden z.B. über eine Oxim-Ligation oder eine Click-Reaktion notwendig sind.

Ghadiri und Mitarbeiter entwickelten Anfang der Neunzigerjahre selbst assoziierende zyklische Peptide, welche aus einer geradzahligen Anzahl alternierend angeordneter D- und L-Aminosäuren bestehen.<sup>[165-167]</sup> Bei diesen starren Ringstrukturen sind alle Amidgruppen des Peptidrückgrats senkrecht zur Ringebene orientiert, sodass sich die zyklischen Peptide in einer antiparallelen  $\beta$ -Falltblattstruktur aufeinander stapeln und durch intermolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert werden. Auf diese Weise bilden sich tubuläre Strukturen von mehreren hundert Nanometern Länge aus. Die Seitenketten der Aminosäurereste liegen zwangsläufig radial außerhalb der Ringebenen. Diese zyklischen Peptide können in dualer Weise als multivalentes Gerüststruktur dienen: Zum einen können mehrere Liganden innerhalb eines Rings über die Seitenkettenfunktionen der Aminosäure eingeführt werden. Und zum anderen erhält man selbst bei der Einführung von nur einem einzelnen Liganden pro Peptid durch die Selbstassoziation der Ringe ein multivalentes System (siehe Abbildung 18 a). Die Einführung von glykosylierten Aminosäuren ist über Standardmethoden möglich.

Eine aktuelle Studie zeigte, dass die spezifische Glykosylierung von membranaktiven selbstassoziiierenden zyklischen D,L- $\alpha$ -Peptiden die Toxizität gegenüber Säugetierzellen deutlich minimieren kann, wobei gleichzeitig die antibakteriellen Eigenschaften gegenüber multiresistenten grampositiven Bakterien erhalten bleiben.<sup>[168]</sup>

Bei den zyklischen Peptiden mit axial angeordneten Liganden befinden sich diese in räumlicher Nähe zueinander und treten daher leicht miteinander in Wechselwirkung. Diese räumliche Nähe ist für einige Anwendungen aber durchaus erwünscht und umfasst im Wesentlichen drei Gebiete: (1) Entwicklung neuer immunologisch aktiver Substanzen mit Avidität durch die multivalente Anordnung von scFv-Antikörpern; (2) Templat-induzierte Faltung von Peptiden als Modell für Proteinstrukturen; und (3) Generierung von Modellpeptidstrukturen zu Untersuchung der oligomeren Zwischenstufen während der Amyloid-Aggregation.

Mutter und Mitarbeiter führten den Begriff der Templat-assoziierten synthetischen Proteine (TASP) ein und stellten mit ihrem Konzept auch peptidische Ringstrukturen vor, an welche durch geschickt gewählte Schutzgruppenstrategien unterschiedliche Liganden in axialer Orientierung zur Ringebene eingeführt werden können.<sup>[169]</sup> Diese zyklischen Decapeptid-Gerüste, die so genannten RAFTs (*regioselectively addressable functionalized template*), haben zwei funktionell voneinander unabhängige Domänen, um insgesamt bis zu sechs Liganden gleichzeitig einführen zu können (siehe Abbildung 18 b).<sup>[170]</sup> Auf einer Seite der Ringebene können vier Liganden und auf der anderen Seite zwei weitere Liganden präsentiert werden. Die Liganden werden typischerweise über Lysin- oder Cysteinreste eingeführt. Das System eignet sich daher hervorragend, um vier Liganden in der so genannten Clusterdomäne in räumlicher Nähe zueinander zu präsentieren und über die zwei weiteren Ligandenstellen Marker oder aber auch Therapeutika zu binden. Die RAFTs haben ihre primäre Anwendung in der induzierten Faltung von Proteinstrukturmotiven wie z.B.  $\alpha$ -helikale Bündel<sup>[171-174]</sup>. Die definierte Templatstruktur wurde in jüngster Zeit aber auch als Modell für Protofibrillen bei der Amyloid-Aggregation genutzt.<sup>[175]</sup> Natürlich kann man auch hier von multivalenten Wechselwirkungen sprechen, da die Aminosäureseitenketten in einer kooperativen Weise miteinander agieren. Es gibt aber auch einige Beispiele, die die klassischen multivalenten Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen adressieren. Renaudet *et al.* nutzten das RAFT, um vier Monosaccharide in räumlicher Nähe zueinander zu präsentieren.

Auf diese Weise könnte die Bindungsaffinität zu Concanavalin A, einem tetrameren  $\alpha$ -Mannose-spezifischen pflanzlichen Lektin, um das 20-fache im Vergleich zum monovalenten Liganden verstärkt werden.<sup>[176]</sup> In einer weiteren Studie inkorporierten sie die immunaktive Pentapeptidsequenz LELTE zusammen mit dem Kohlenhydrat Epitop  $\alpha$ GalNAc in ein RAFT-basiertes Cyclopeptid.<sup>[177]</sup> Die multivalenten Substanzen erwiesen sich als hoch-effektive Aktivatoren für natürliche Killerzellen, ohne die üblichen unerwünschten Begleiterscheinungen wie z.B. induzierte Apoptose zu zeigen. Dabei waren die dualen Peptid/Kohlenhydrat-RAFTs im Vergleich zu den unglykosylierten RAFTs wesentlich effektiver, was für eine Kommunikation zwischen den verschiedenen Rezeptorfamilien spricht. In einem anderen Beispiel wurden vier Cyclopeptide als  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Liganden über Oxim-Ligation in die Clusterdomäne eines RAFT-basierten Peptidrückgrats eingeführt.<sup>[178]</sup> Die beiden anderen Substitutionspositionen auf der anderen Seite der RAFT-Ebene wurden für die Einführung von Biotin oder Fluoreszenzmarkern genutzt.

Chopra *et al.* entwickelten kürzlich zwei neue zyklische Peptidrückgratstrukturen, um Liganden in einer axialen Anordnung zu präsentieren.<sup>[179]</sup> In ihrem ersten System wechseln sich  $\beta$ -Aminosäuren in D- und L-Konfiguration in der Peptidsequenz ab (cyclo[-(D- $\beta$ Xaa-L- $\beta$ Xaa)<sub>n</sub>-]). Durch die zusätzlichen Methyleneinheiten der  $\beta$ -Aminosäuren sind die Peptidseitenketten, und somit die Anknüpfungspunkte für die Liganden, axial orientiert. Das zweite zyklische System besteht hingegen aus alternierenden D- und L- $\alpha$ -Aminosäuren, zwischen welchen sich im Gegensatz zu Ghadiris Ringstrukturen zusätzlich achirale Glycinreste befinden (cyclo[-(D-Xaa-Gly-L-Xaa-Gly)<sub>n</sub>-]). Durch die Glycinreste werden die Seitenketten axial orientiert und die Ringstruktur wird außerdem flexibler. Diese zyklischen Peptidrückgratstrukturen eignen sich sowohl zur Präsentation von Proteinen, wie am Beispiel von Trypsin und NeutrAvidin gezeigt wurde, sowie als Templat, um oligomere Zwischenstufen bei der Fibrillenbildung von amyloidogenen Peptiden zu simulieren.

### 5.3.4 Vor- und Nachteile Peptid-basierter Gerüststrukturen

Nach diesem Einblick in die verschiedenen Peptidrückgrat-basierten Gerüststrukturen kann man deren Vorteile wie folgt zusammenfassen:

- ◆ Die synthetischen Werkzeuge sind mit der chemischen Festphasenpeptidsynthese und der orthogonalen Schutzgruppenstrategie etabliert. Größere Peptidrückgratstrukturen sind durch Ligation, Polymerisierung oder aber auch durch Expression zugänglich. Die Seitenkettenfunktionalitäten der Aminosäuren ermöglichen einem die einfache Einführung von unterschiedlichsten Liganden.
- ◆ Durch die gezielte Einführung von Liganden erhält man ein monodisperses System. Der Abstand der einzelnen Liganden zueinander kann bei einigen Templaten wie der  $\alpha$ -Helix oder Cyclopeptiden kontrolliert werden.
- ◆ Die Peptid-basierten Gerüste sind von der Natur adaptiert und daher biokompatibel. Das heißt, sie haben eine niedrige Toxizität und Immunogenität und sind gut wasserlöslich sowie bioabbaubar.

Dennoch gibt es einige Nachteile gegenüber nicht natürlichen Gerüststrukturen:

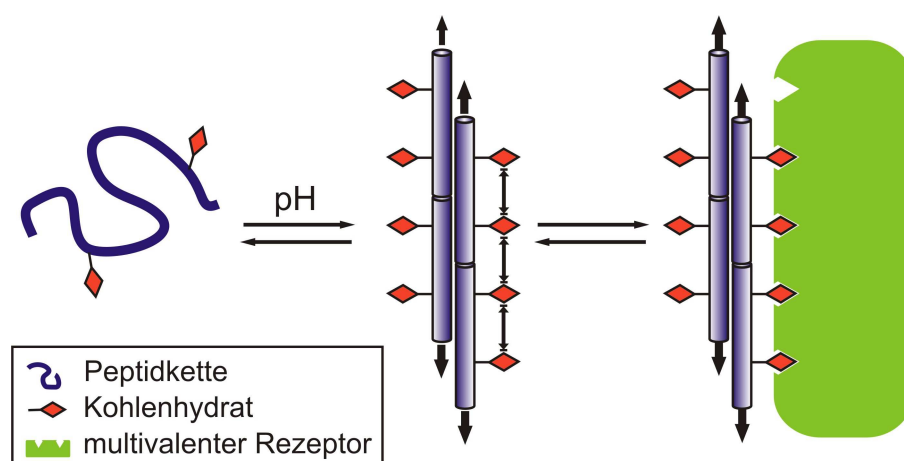
- ◆ Peptide sind dem natürlichen Abbau durch Proteolyse unterworfen.
- ◆ Die Synthese langer spezifischer Peptidsequenzen ist teilweise schwierig und zudem relativ kostspielig.
- ◆ Um größere Rezeptorabstände zu überbrücken, benötigt man ein langes Peptidrückgrat. Dies ist meist flexibel und somit ist es schwer, den Abstand zwischen den einzelnen Liganden zu kontrollieren bzw. den Verlust der Konformationsentropie bei der Rezeptorbindung zu minimieren.
- ◆ Die Seitenketten der Aminosäuren bieten zusätzliche Funktionalitäten an, die mit den Rezeptormolekülen in Wechselwirkung treten können. So ist eine Differenzierung zwischen den energetischen Beiträgen der multivalenten Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen und weiteren unspezifischen Wechselwirkungen mit den Peptidseitenketten schwierig.



## 6 GLYKOSYLIERTE *COILED COIL*-PEPTIDE ALS MULTIVALENTE GERÜSTSTRUKTUREN

### 6.1 Konzept

Mit der Nutzung des  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Motivs als multivalente Gerüststruktur sollen einige Nachteile herkömmlicher Peptid-basierter Systeme überwunden werden. Zum einen können Liganden, welche über die Seitenkettenfunktionalität der Aminosäuren eingeführt werden, aufgrund der sich wiederholenden Primärstruktur in einem definierten Abstand zueinander präsentiert werden. Des Weiteren ist bekannt, dass *coiled coil*-Peptide durch Überlappen der Helixenden lange Fasern bilden können.<sup>[180]</sup> Hierdurch sollte es möglich sein, auch weite Rezeptorabstände zu überbrücken, ohne dass die komplexe Synthese langer Peptidsequenzen erforderlich wird. Die Abstände der Liganden können durch die Anzahl der Kohlenhydratreste und die Position innerhalb des Heptads variiert werden. Durch die Einführung von geladenen Aminosäuren in die Peptidsequenz kann das *coiled coil*-System gegenüber verschieden Stimuli wie z.B. dem pH-Wert oder der Ionenkonzentration sensibilisiert werden. Auf diese Weise könnte es möglich sein das System in die Lage zu versetzen erst am Einsatzort seine aktive Konformation anzunehmen. Zudem ist bekannt, dass die Glykosylierung von Peptiden zu proteasestabilen Derivaten führt.<sup>[79, 80, 181]</sup> In Abbildung 19 wird das beschriebene Konzept skizziert.



**Abbildung 19:** Das ungefaltete *coiled coil*-Peptid nimmt durch eine pH-Wert-Änderung seine native Konformation ein. Durch das Heptad-Wiederholungsmuster werden die Glykosylliganden in definierten Abständen an der *coiled coil*-Faser exponiert und eine Rezeptorwechselwirkung kann stattfinden.

## 6.2 Glykopeptidsynthese

### 6.2.1 Synthese des Glykosyl-Aminosäure-Bausteines (Gal-)Ser

In der vorliegenden Arbeit wurden die Glykopeptide nach der *building-block*-Strategie synthetisiert. Hierfür wurde zuerst der Glykosyl-Aminosäure-Baustein (Gal-)Ser synthetisiert und dieser anschließend mittels konventioneller Fmoc-Schutzgruppenstrategie durch Festphasenpeptidsynthese in diverse Peptide eingebaut (siehe Abbildung 20). Die Synthese des Bausteines (Gal-)Ser ging von der Pentaacetat-geschützten Galactose aus und folgte einer Synthesevorschrift von Kihlberg *et al.*<sup>[182]</sup> Das genaue Syntheseprotokoll ist den folgenden Veröffentlichungen zu entnehmen.<sup>[183, 184]</sup>

### 6.2.2 Festphasenpeptidsynthese der Glykopeptide

Die Glykopeptidsynthesen erfolgten automatisiert mit Hilfe eines Peptidsyntheseroboters und den Kupplungsreagenzien TBTU / HOBt / DIEA. Da die Acetat-Schutzgruppen des Zuckers allerdings sind, wurde die Kupplung des Glykosyl-Aminosäure-Bausteins manuell mit Hilfe von DIC / HOAt ohne DIEA durchzuführen. Das ausführliche Syntheseprotokoll ist den Veröffentlichungen zu entnehmen.<sup>[183, 184]</sup> Abbildung 20 zeigt eine schematische Darstellung der Glykopeptidsyntheseroute.

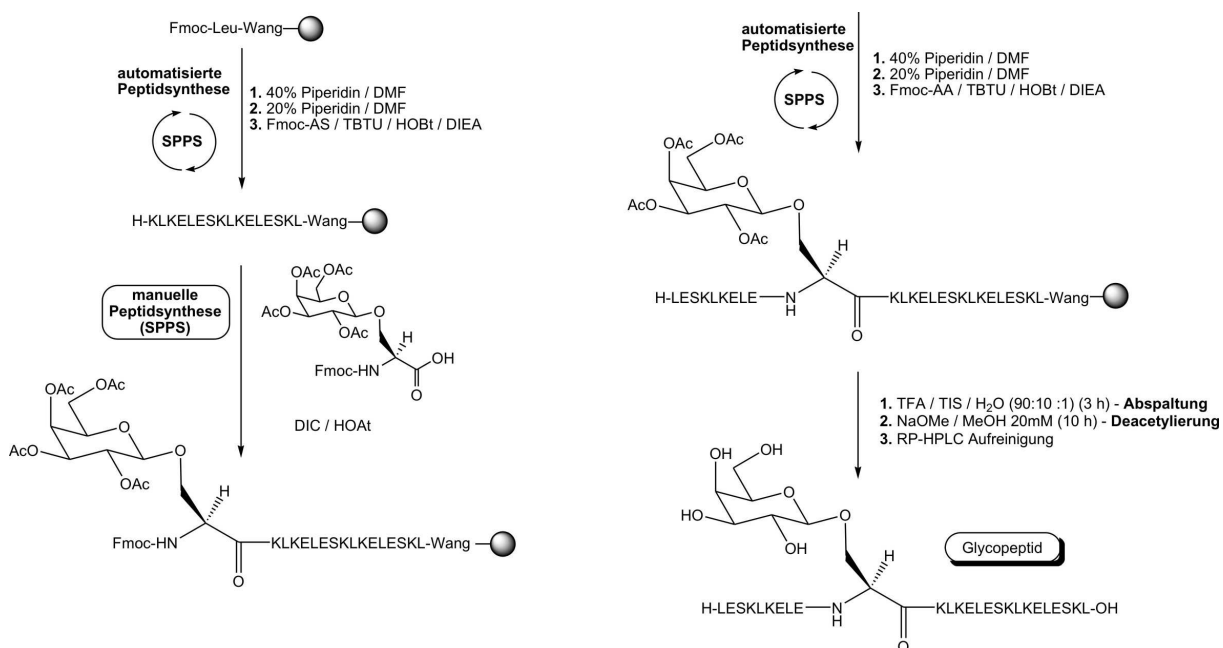


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Glykopeptidsynthese mittels Festphasenpeptidsynthese (SPPS).

### 6.3 *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18(11), 3703-3706

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse wurden unter dem folgenden Titel im Original veröffentlicht:

◆ **J.A. Falenski, U.I.M. Gerling, B. Kokschi,**

*Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18(11), 3703-3706.

”Multiple glycosylation of de novo designed  $\alpha$ -helical coiled coil peptides”

Die Originalveröffentlichung ist erhältlich unter:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.03.061>

Die hier abgedruckte Veröffentlichung wurde mit Genehmigung des Verlages reproduziert (Copyright © 2010, Elsevier).

#### **Erklärung:**

Eigenleistungen an diesen Veröffentlichungen sind: Konzeption der Versuche, Peptid-design, Synthese und Charakterisierung des Glykosyl-Aminosäure-Bausteins, Peptidsynthese, Glykopeptidsynthese, ESI-MS, CD-spektroskopische Untersuchungen, Manuskriptverfassung.

Folgende Kooperationen sind an den Veröffentlichungen beteiligt: Ulla I. M. Gerling (Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin) hat die analytische Ultrazentrifugation der Peptide durchgeführt und ausgewertet.

## ZUSAMMENFASSUNG DER VERÖFFENTLICHUNG:

"Multiple Glykosylierungen von *de novo* entworfenen  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Peptiden"

Die Untersuchung von vielfach glykosylierten Peptiden ist von großer Bedeutung, da die meisten Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen – einschließlich der Wirtserkennung vieler Bakterien und Viren – von multivalenter Natur sind. Diese Studie adressiert den Einfluss von multiplen *O*-Glykosylierungen auf die Konformation und Stabilität der  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Struktur, um weitere Erkenntnisse über den komplexen Mechanismus der Proteinfaltung zu gewinnen. Damit sollte evaluiert werden, ob sich das *coiled coil*-Strukturmotiv als multivalente Gerüststruktur für die Präsentation von Glykosylliganden eignet.

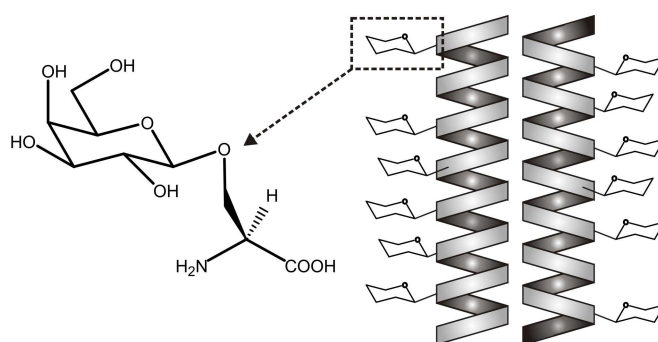
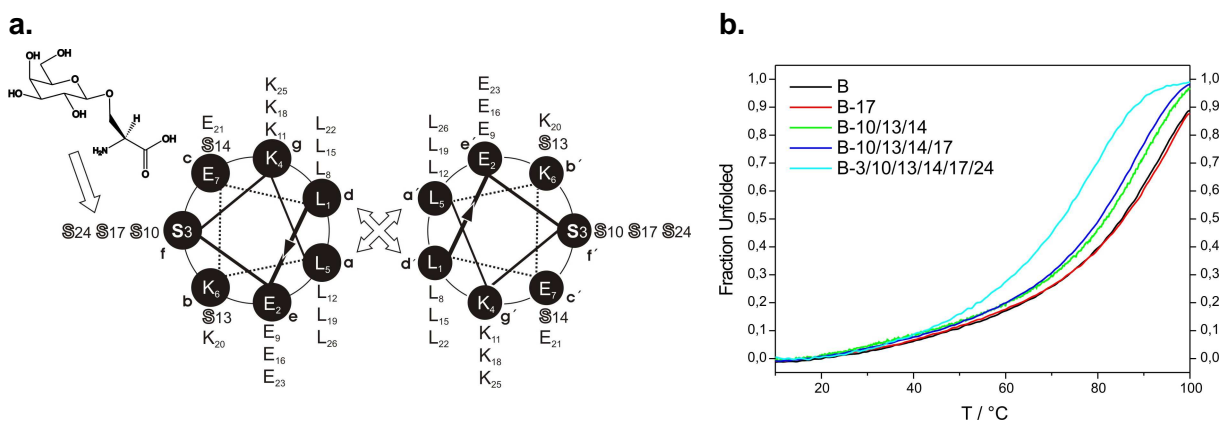


Abbildung 21: Schematische Darstellung des hyperglykosylierten *coiled coil*-Peptids.

Hierfür wurden sieben Glykopeptide synthetisiert, in welche systematisch ein bis sechs  $\beta$ -D-Galactosereste über die dem Lösungsmittel exponierten Serinseitenketten in den Positionen *b*, *c* und *f* eines 26 Aminosäuren langen *coiled coil*-Peptids eingeführt wurden. Die Konformation aller Peptide wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht und deren Stabilitäten über die temperaturinduzierte Denaturierung bestimmt. Des Weiteren wurde der Oligomerisierungsgrad des unglykosylierten Basispeptids B und des hyperglykosylierten Peptids B-3/10/13/14/17/24 mittels der analytischen Ultrazentrifugation bestimmt.

Die CD-Spektren zeigten, dass alle untersuchten Glykopeptide in eine  $\alpha$ -helikale *coiled coil*-Struktur falten. Sowohl das unglykosylierte Basispeptid als auch das mit sechs  $\beta$ -Galactoseresten modifizierte Glykopeptid liegen der analytischen Ultrazentrifugation zufolge als Dimer vor. Die temperaturinduzierten Denaturierungskurven zeigen eine

sukzessive aber unerwartet geringe Destabilisierung mit zunehmender Glykosylierung. Selbst das Peptid B-3/10/13/14/17/24, welches pro *coiled coil*-Dimer zwölf Zuckerreste trägt, hat einen Schmelzpunkt von über 70°C.

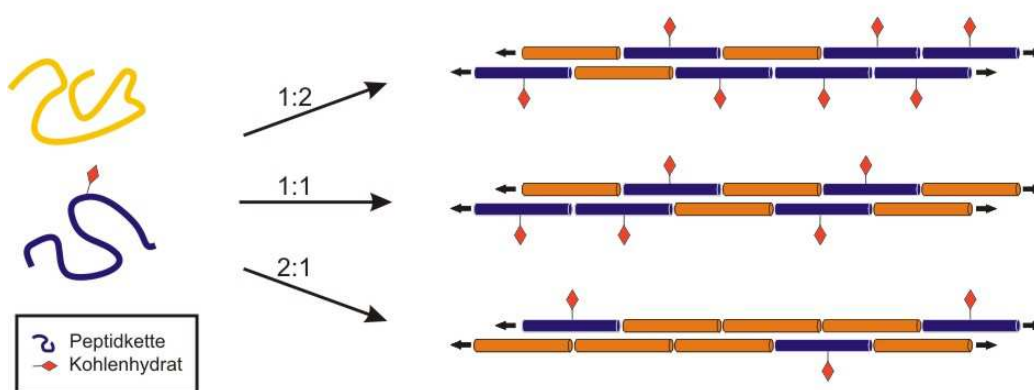


**Abbildung 22:** (a) Helical-Wheel-Darstellung des Basis Peptids B und der O-glykosylierten Aminosäure Serin mit den gekennzeichneten Glykosylierungspositionen 3, 10, 13, 14, 17 und 24. (b) Temperaturinduzierte Denaturierungskurven, die durch die Observation des CD-Signals bei 222 nm aufgenommen wurden.

Die Studie zeigt, dass die multiple O-Glykosylierung mit dem Monosaccharid  $\beta$ -D-Galactose in den dem Lösungsmittel exponierten Positionen des *coiled coil*-Peptids sehr gut toleriert wird und dieses Faltungsmotiv daher großes Potential als multivalente Gerüststruktur hat.

## 6.4 Design eines faserbildenden multivalenten *coiled coil*-Peptids

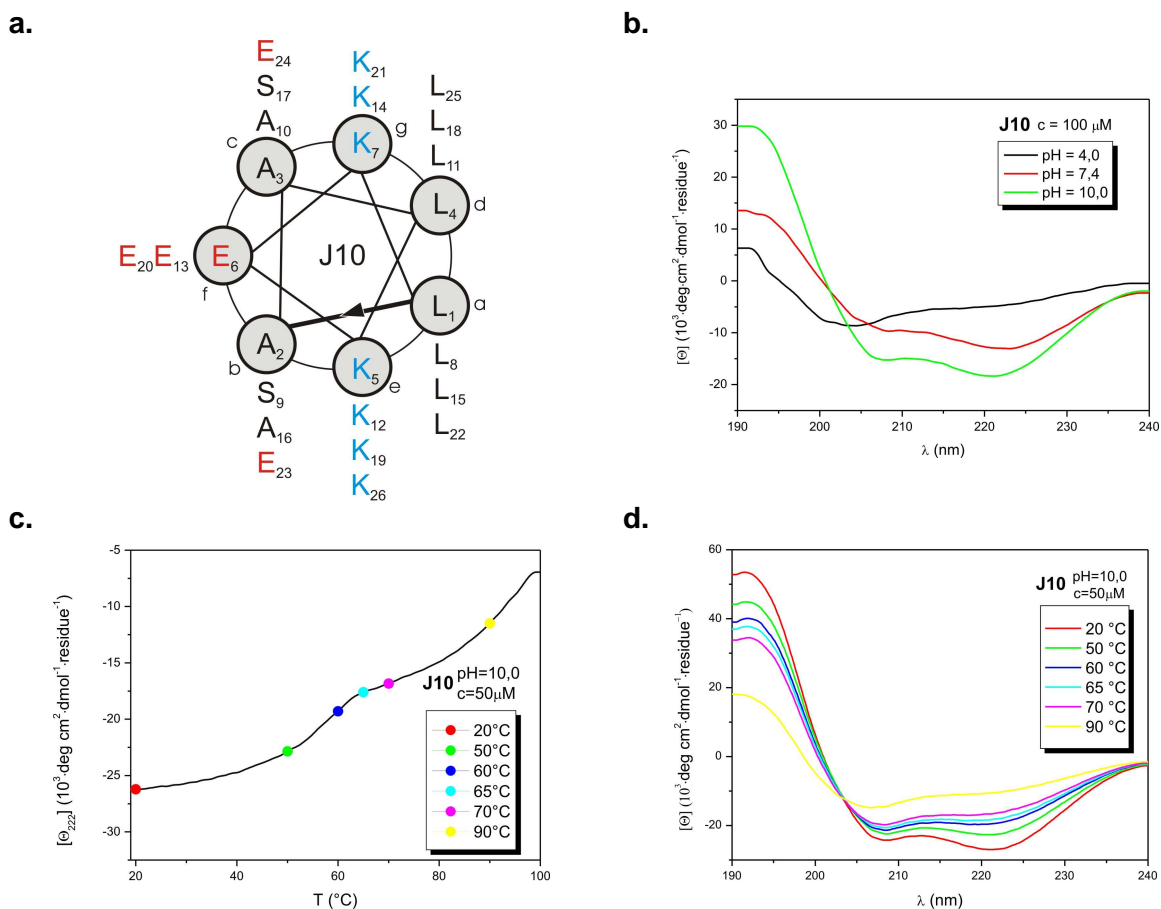
Nachdem die Toleranz der *coiled coil*-Struktur gegenüber extensiver Glykosylierung in den dem Lösungsmittel exponierten Positionen bewiesen werden konnte, bestand der nächste Schritt darin, die Valenz des Systems zu erhöhen und die Abstände der Kohlenhydrat-Liganden zueinander zu vergrößern. Dies sollte durch den Einsatz von faserbildenden *coiled coil*-Peptiden erreicht werden. Durch die überlappende Anordnung von *coiled coil*-Helices können aus synthetisch leicht zugänglichen kurzen Peptidsequenzen makromolekulare Strukturen erzeugt werden.<sup>[180, 185]</sup> Um eine möglichst große Variabilität an Ligandenabständen ohne hohen Synthesaufwand abzudecken, wurde ein heteromeres Designkonzept erarbeitet, welches in Abbildung 23 skizziert ist. Das multivalente System besteht aus zwei Peptiden. Dabei ist das eine Peptid unglykosyliert (Abbildung 23 orange) und das andere Peptid trägt ein oder mehrere *O*-glykosidisch gebundene Glykosylliganden (Abbildung 23 blau). Durch das Mischen dieser beiden Peptide in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander erhält man eine Bibliothek von multivalenten Peptidnanofasern, in denen sich die Glykosylliganden durch die statistische Verteilung in unterschiedlichen Abständen zueinander befinden.



**Abbildung 23:** Heteromeres System faserbildender *coiled coil*-Peptide. Durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse von Peptid (orange) und Glykopeptid (blau) erhält man variable Ligandenabstände.

### 6.4.1 Peptid J10

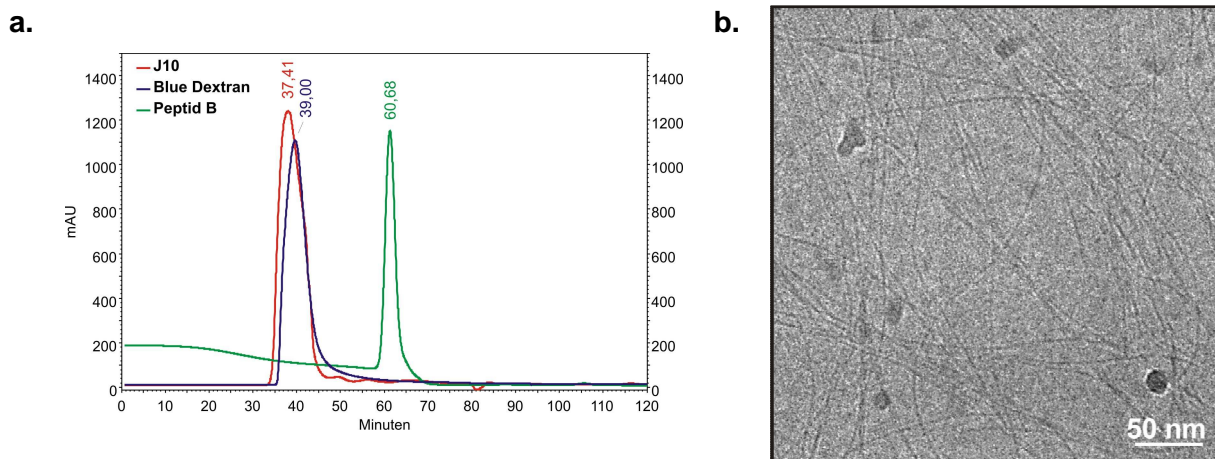
Das frühe Designkonzept der faserbildenden *coiled coil*-Peptide geht auf das Peptid J10 zurück.<sup>[186]</sup> Dieses Peptid besitzt in den Positionen *e* und *g* eine homogene elektrostatische Domäne aus Lysinresten (siehe Abbildung 24 a). Dies erlaubt eine unspezifische interhelikale Assoziation der *coiled coil*-Helices – das bedeutet eine parallele oder antiparallele Orientierung, aber auch ein Überlappen der Helixenden. Das CD-Spektrum in Abbildung 24 b zeigt, dass das Peptid bei pH 4, trotz der zu erwartenden interhelikal elektrostatischen Abstoßungen, größtenteils noch helikal gefaltet ist. Sowohl bei pH 10 als auch pH 7,4 zeigt das Peptid bei 208 nm und 222 nm zwei sehr starke CD-Signale. Das etwas tiefer liegende Minimum bei 222 nm ist ein charakteristisches Merkmal für die Bildung von höheren Oligomeren.<sup>[187, 188]</sup> Das Peptid ist bei pH 10 am stabilsten, da hier die interhelikale elektrostatische Abstoßung durch Deprotonierung der Lysinreste minimal wird.



**Abbildung 24:** (a) Helical-Wheel Darstellung des Peptids J10. CD-Spektren von Peptid J10: (b) pH-Wert-abhängige CD-Spektren; (c) Denaturierungskurve bei pH 10,0; (d) temperaturabhängige CD-Spektren bei pH 10,0.<sup>[186]</sup>

Die Denaturierungskurve bei pH 10 zeigt, dass die Entfaltung über einen ungewöhnlichen Dreistufenmechanismus erfolgt (siehe Abbildung 24 c).<sup>[189]</sup> Betrachtet man die zugehörigen CD-Spektren (siehe Abbildung 24 d), erkennt man, dass am Sattelpunkt bei ca. 65°C die beiden Minima bei 208 nm und 222 nm auf einer Höhe sind. Im ersten Schritt der Denaturierung dissoziieren demzufolge höhere helikale Oligomere und im zweiten Schritt erst die *coiled coil*-Struktur in ungefaltete Monomere.

Um die Größe und die oligomere Struktur von J10 zu bestimmen, wurde dieses Peptid im Rahmen dieser Doktorarbeit mittels der Größenausschlusschromatographie und der Transmissionselektronenmikroskopie bei pH 10 weitergehend charakterisiert. Das Größenausschlusschromatogramm in Abbildung 25 a zeigt deutlich, dass Peptid J10 mit dem Ausschlussvolumen eluiert wird und demzufolge hoch aggregiert ist. Zum Vergleich sind die Chromatogramme von Blue Dextran (MW: 2.000.000) sowie dem dimeren *coiled coil* Peptid B (MW<sub>Dimer</sub>: 6213,48; mittels analytischer Ultrazentrifugation charakterisiert<sup>[183]</sup>) eingefügt. Um weitere Informationen über die Morphologie der polymeren Struktur von J10 zu erhalten, wurden Cryo-TEM Bilder aufgenommen. Diese zeigen, dass Peptid J10 bei pH 10 sehr lange, steife, dünne und unverzweigte Nanofasern ausbildet (siehe Abbildung 25 b).



**Abbildung 25:** (a) Größenausschlusschromatogramm von J10 (rot; Superdex75 PC3.2/30; 0,025 ml/min; in Carbonatpuffer 10 mM und 150 mM NaCl bei pH 10); Referenzchromatogramme von Blue Dextran (blau, MW ~2.000.000 g/mol) und dem dimeren *coiled coil* Peptid B (grün, MW<sub>Dimer</sub>=6213,48 g/mol). (b) Cryo-TEM Bild von J10 (350 µM, pH 10,1).

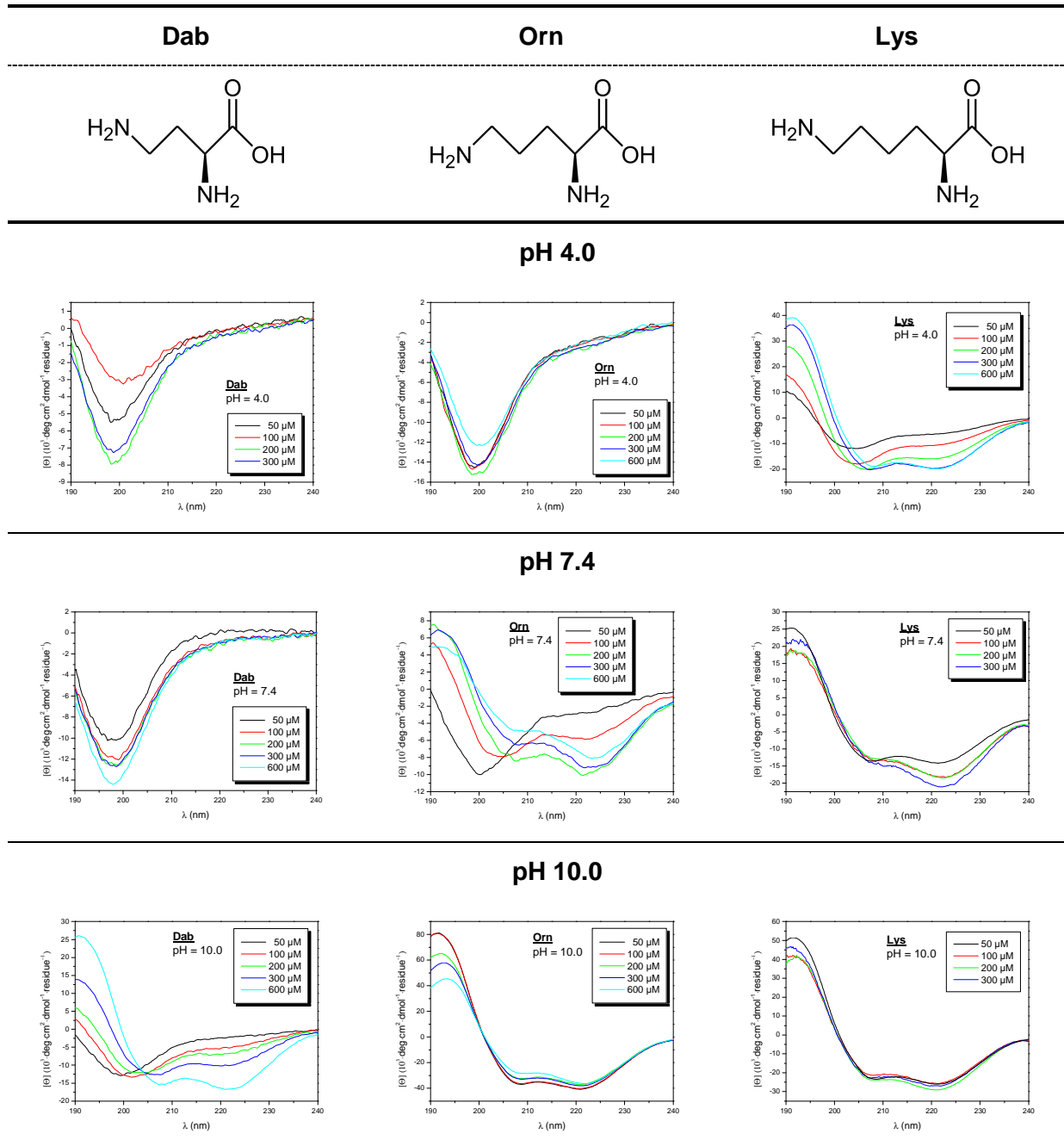
#### 6.4.2 Bedeutung der Aminosäureseitenkettenlänge in den Positionen e und g

Aufgrund der überraschend hohen Stabilität des Peptids J10 und der Eigenschaft, Nanofasern zu bilden, wurde der Einfluss der Aminosäureseitenkettenlänge in den Positionen e und



g weitergehend untersucht. Hierfür wurden zwei weitere Peptide mit den nichtproteinogenen Aminosäuren Ornithin (Orn) und Diaminobuttersäure (Dab) in den Positionen e (5, 12, 19) und g (7, 14, 21) synthetisiert und somit die Aminosäureseitenkettenlänge um eine bzw. zwei CH<sub>2</sub>-Einheiten verkürzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Strukturformeln von Diaminobuttersäure, Ornithin und Lysin und die pH-Wert- und konzentrationsabhängigen CD-Spektren des Peptids J10 sowie der Ornithin und Diaminobuttersäure-Analoga.

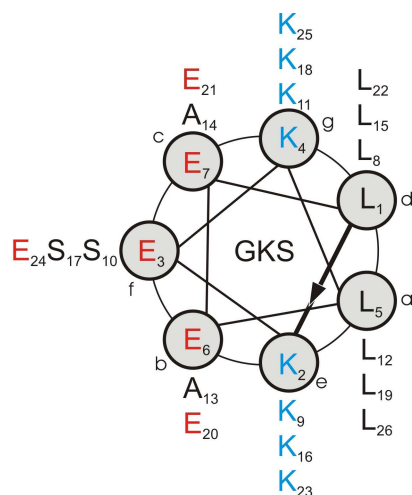


Die CD-Spektren zeigen, dass die Seitenkettenlänge der interhelikal elektrostatischen Wechselwirkungsdomäne einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der *coiled coil*-Struktur hat. Das Lysin-Peptid J10 liegt bei allen untersuchten pH-Werten in einer helikalen Struktur vor. Durch das ausgeprägte Minimum bei 222 nm ist zu erkennen, dass bei höherer Peptidkonzentration helikale Oligomere gebildet werden. Das Ornithin-Peptid faltet hingegen erst bei pH 7,4 und ab einer Peptidkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  und das Diaminobuttersäure-Peptid sogar erst bei pH 10 und ab einer Peptidkonzentration von 300  $\mu\text{M}$  in eine überwiegend helikale Struktur. Die langen hydrophoben Anteile der Seitenketten in den Positionen *e* und *g* können offenbar die interhelikale hydrophobe Wechselwirkungsdomäne abschirmen bzw. sind in dessen Erweiterung einbezogen. Selbst bei abstoßender Ladung der Lysinreste wird eine stabile *coiled coil*-Helix gebildet. Die hier präsentierten Ergebnisse sind unabhängig und zeitgleich durch Kennan *et al.* bestätigt worden.<sup>[190]</sup>

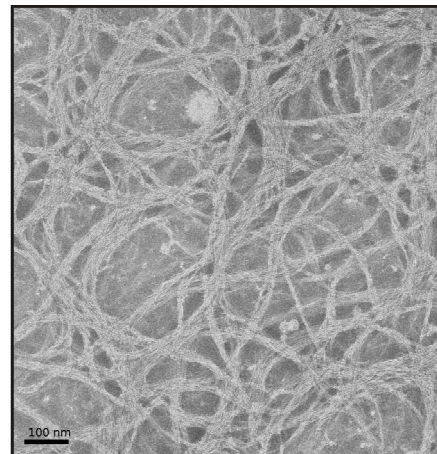
### 6.4.3 Peptid GKS

Aufbauend auf dem *coiled coil*-Design des faserbildenden Peptids J10 wurde eine Peptid-basierte Gerüststruktur für die Präsentation von Glykosylliganden entwickelt.

a.



b.

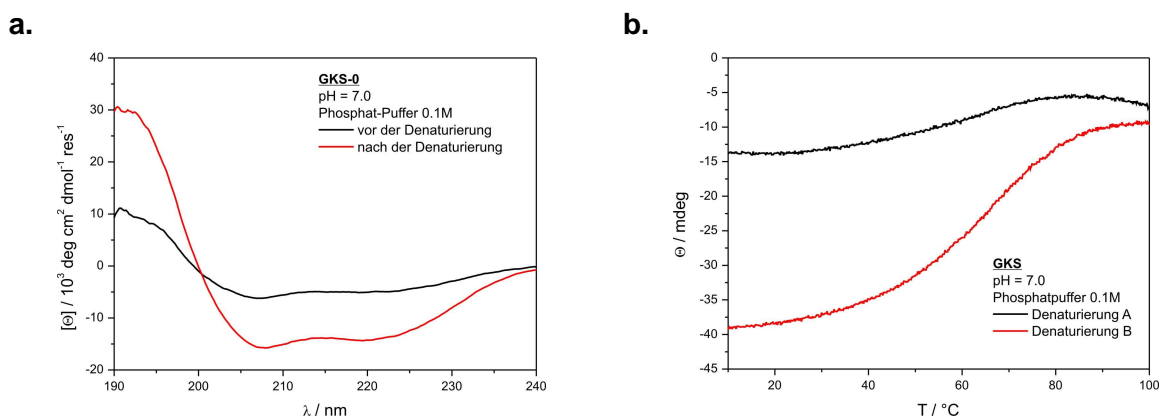


**Abbildung 26:** (a) Helical-Wheel Darstellung des Glyko-Basispeptids GKS. (b) TEM-Bild von 100  $\mu\text{M}$  GKS bei pH 10 (Negativfärbung mit 1% Phosphorwolframsäure).

Um die faserbildenden Eigenschaften zu erhalten wurden im Glyko-Basispeptid GKS die Leucinreste in den Positionen *a* und *d* und die Lysinreste in den Positionen *e* und *g* beibehalten. Die dem Lösungsmittel exponierten Positionen wurden hingegen modifiziert, um

eine *O*-Glykosilierung zu ermöglichen. In Position *b* und *c* befinden sich zum einen Glutamatreste, um die Nettoladung des Peptids auszugleichen und Alaninreste, um die Neigung zur Helixbildung zu erhöhen. In Position *f* wurden aber neben zwei Glutamatresten zusätzlich zwei Serinreste für den späteren Einbau von  $\beta$ -D-Galactose eingeführt (siehe Abbildung 26 a).

Schon beim Lösen neigt Peptid GKS offensichtlich zur Aggregation. Im pH-Bereich von 6-8 ist die Peptidlösung trüb. Erst nach dem temperaturinduzierten Denaturieren und dem anschließenden Abkühlen ist sie klar aber hoch viskos. Aufgrund dieser Aggregation war es schwierig, TEM Bilder im physiologischen pH-Bereich zu erhalten. Abbildung 26 b zeigt ein TEM Bild bei pH 10. Hier ist zu sehen, dass das Peptid GKS unter diesen Bedingungen lange dünne Fasern ausbildet, die sich zu Bündeln zusammenlagern. Im CD-Spektrum ist die helikale *coiled coil*-Konformation des Peptids eindeutig an den beiden Minima von 208 nm und 222 nm zu erkennen (siehe Abbildung 27 a).



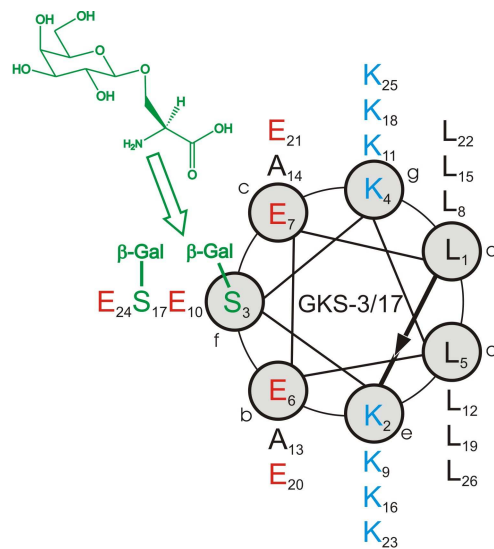
**Abbildung 27:** (a) CD-Spektren von Peptid GKS bei 10 °C und nach Denaturierung A ( $c=100 \mu\text{M}$ , 100 mM Phosphatpuffer pH 7,0, 150 mM NaCl). (b) Aufeinander folgende Temperatur induzierte Denaturierungskurven von Peptid GKS ( $c=100 \mu\text{M}$ , 100 mM Phosphatpuffer pH 7,0, 150 mM NaCl).

Interessanterweise ist die Intensität des CD-Signals zunächst relativ gering. Diese erreicht aber nach der ersten temperaturinduzierten Denaturierung und der anschließenden Renaturierung eine charakteristische Signalstärke. Wiederholtes Denaturieren und Renaturieren führt zu keiner weiteren relevanten Erhöhung des CD-Signals. Eine Erklärung für dieses Verhalten ist, dass sich beim Lösen des Peptids unmittelbar eine Vielzahl an Peptidnanofasern ausbildet, die durch das rasche Wachstum aber relativ ungeordnet sind. Nach der temperaturinduzierten Denaturierung werden hingegen in einer Art Keimbildungsschritt wenige Dimere

gebildet, an welche sich beim langsamen Abkühlen der Lösung monomere Peptideinheiten anlagern, sodass geordnete langkettige Nanofasern entstehen.

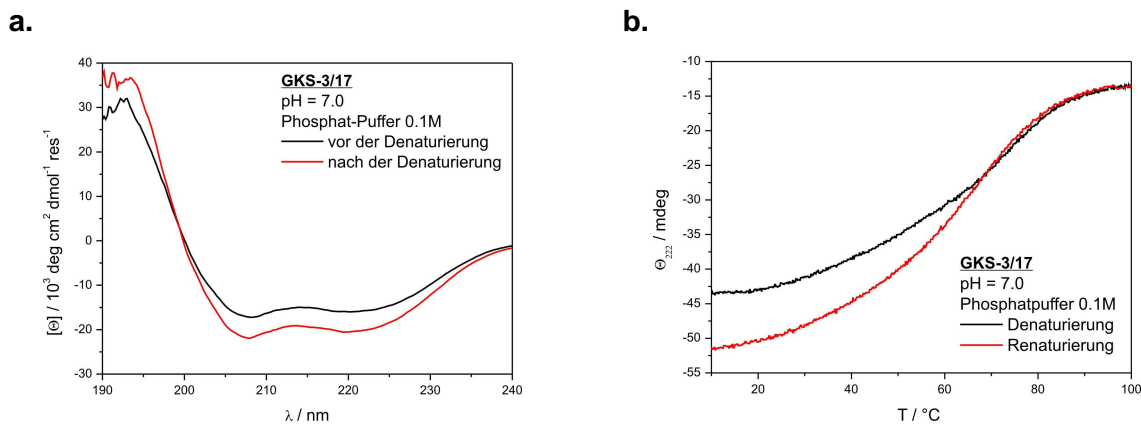
#### 6.4.4 Peptid GKS-3/17

In Peptid GKS-3/17 wurde  $\beta$ -D-Galactose *O*-glycosidisch über zwei Serinreste in die Lösungsmittel exponierten Positionen 3 und 17 eingeführt (siehe Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Helical-Wheel-Darstellung des Glykopeptids GKS-3/17. In grün ist der *O*-glykosylierte Serinrest dargestellt.

Das CD-Spektrum in Abbildung 29 a zeigt, dass auch dieses Peptid eine  $\alpha$ -helikale *coiled coil*-Konformation annimmt. Der Effekt der CD-Signalerhöhung nach der Temperatur-induzierten Denaturierung und der anschließenden Renaturierung ist hier ebenfalls zu beobachten, aber er ist bei weitem nicht so ausgeprägt. Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass multivalente *coiled coil*-Peptide vielversprechende Gerüststrukturen für die Untersuchung multivalenter Wechselwirkungen sind. In weiterführenden Experimenten muss jetzt unter anderem die Proteasestabilität dieser Gerüste und vor allem die Bindung an natürliche Glykorezeptoren getestet werden. Für die verschiedenen biologischen Assays wie der Durchflusszytometrie und der konfokalen Fluoreszenz-Spektroskopie wurden sowohl das Basispeptid GKS als auch das Glykopeptid GKS-3/17 *N*-terminal mit dem Fluoreszenzlabel 5(6)-Carboxyfluorescein synthetisiert.



**Abbildung 29:** (a) CD-Spektren von Peptid GKS-3/17 bei 10 °C vor und nach der Denaturierung ( $c=100 \mu\text{M}$ , 100 mM Phosphatpuffer pH 7,0, 150 mM NaCl). (b) Temperaturinduzierte Denaturierungs- und Renaturierungskurve von Peptid GKS-3/17 ( $c=100 \mu\text{M}$ , 100 mM Phosphatpuffer pH 7,0, 150 mM NaCl).

In zukünftigen Studien soll die Bindung des *de novo* entwickelten multivalenten Glykopeptids GKS-3/17 an verschiedenste Lektine wie z.B. dem Asialoglykoprotein-Rezeptor, welcher von der hepatozellulären Krebszelllinie HepG2 exprimiert wird, untersucht werden. Hierbei soll das Glykopeptid mit dem unglykosylierten Peptid GKS in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt werden, sodass man eine große Bandbreite an Ligandenabständen erhält, um das System auf diese Weise für die Anwendung an verschiedene Rezeptoren anzupassen.

# TEIL 3

## DIE BEDEUTUNG VON *O*-GLYKOSYLIERUNGEN FÜR DIE AMYLOID-AGGREGATION

## 7 AMYLOIDE

Demenzkrankungen wie Alzheimer stellen im Zusammenhang mit der gravierend zunehmenden Überalterung der Bevölkerung in den Industrieländern ein immer bedeutenderes soziales aber auch ökonomisches Problem für unsere Gesellschaft dar. Schätzungen gehen davon aus, dass die weltweiten Kosten für Demenzkrankungen schon heute 422 Milliarden US\$ betragen.<sup>[191]</sup> Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit aber auch anderer Krankheiten wie Diabetes Typ 2, der Parkinson-Krankheit und der Huntington-Krankheit ist das Auftreten von unlöslichen Proteinablagerungen, so genannten Amyloiden. Die Ablagerungen findet man abhängig von der Krankheit im Gehirn, im Skelettgewebe oder in anderen Organen. Die Aufklärung der Mechanismen dieser Proteinefehlfaltungen, die der Bildung von Amyloiden zugrunde liegen, ist von fundamentaler Bedeutung, um neue Therapieansätze für diese Krankheiten zu entwickeln.

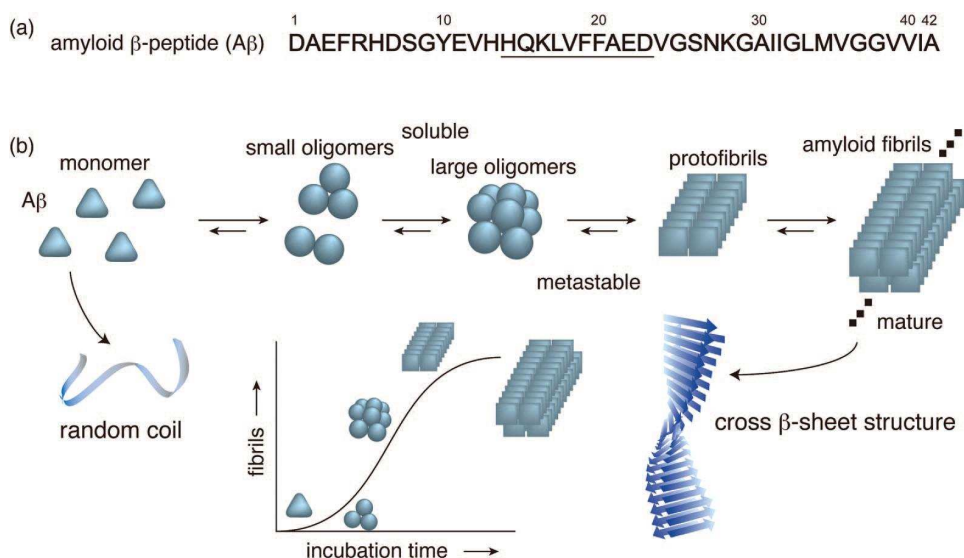
**Tabelle 2:** Eine Auswahl von Krankheiten bei denen Amyloidablagerungen entstehen sowie das jeweilige mit der Amyloidbildung assoziierte Protein.

Krankheit	Amyloid bildendes Protein
Alzheimer	Amyloid $\beta$ (A $\beta$ )
Amyotrophe Lateralsklerose	SOD-1
Atherosklerose	Apolipoprotein AI
Chorea Huntington	Huntingtin
Creutzfeld-Jakob	Prionen Protein (PrP <sup>SC</sup> )
Diabetes Mellitus Typ 2	Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP)
Parkinson	$\alpha$ -Synuclein
Rheumatoide Arthritis	Serum Amyloid A

### 7.1 Alzheimer / Amyloid $\beta$

Ein Hauptkennzeichen der Alzheimer-Krankheit sind die extrazellulären Ablagerungen des Amyloid  $\beta$ -Peptids im Gehirn der Patienten. Das transmembrane Vorläuferprotein APP (*amyloid precursor protein*) wird von zwei Enzymen, der  $\beta$ -Sekretase und der  $\gamma$ -Sekretase, sequenziell gespalten und das A $\beta$ -Peptid wird in verschiedenen langen Isoformen freigesetzt. Von diesen Isoformen bildet das A $\beta$ (1-42), welches am stärksten zur Aggregation neigt, neurotoxische Oligomere und schließlich fibrilläre Ablagerungen (siehe Abbildung 30). Der Verdacht, dass das unlösliche A $\beta$ (1-42) Peptid für die Amyloidbildung und die damit

verbundene Alzheimer-Krankheit verantwortlich ist, wird dadurch erhärtet, dass bei der familiär bedingten Alzheimer-Krankheit die Produktion des A $\beta$ (1-42) gegenüber den anderen Isoformen drastisch erhöht ist.



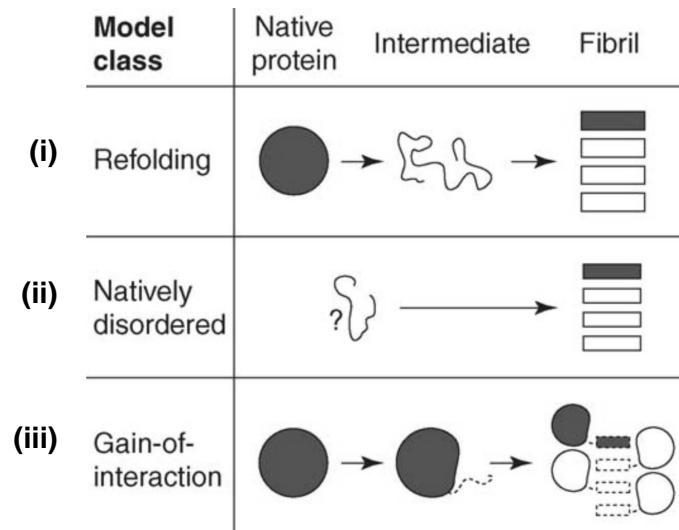
**Abbildung 30:** (a) Aminosäuresequenz des A $\beta$ (1-42) Peptids. Unterstrichen ist die hydrophobe Schlüsselsequenz, welche die Assoziation der  $\beta$ -Faltblätter in Amyloide begünstigt. (b) Schematische Darstellung der Aggregation des A $\beta$ -Monomers über verschiedene metastabile oligomere Zwischenstufen und Protofibrillen bis hin zur Cross- $\beta$  Struktur der amyloidogenen Fibrillen; aus Takahashi et al. <sup>[192]</sup> (Copyright © 2008 American Chemical Society).

Basierend auf diesen Erkenntnissen setzen die therapeutischen Strategien zur Bekämpfung der Alzheimer-Krankheit an den unterschiedlichen Stadien der A $\beta$ -Aggregation an.<sup>[193]</sup> Zum einen werden Sekretase-Inhibitoren entwickelt, die die Produktion des A $\beta$ -Peptids stoppen. Zum anderen wird an dem beschleunigten Abbau der Amyloid-Ablagerung gearbeitet. Hier hat vor allem die Immuntherapie große Aufmerksamkeit erregt. Es sind schon mehr als zehn immuntherapeutische Wirkstoffe in klinischen Studien der Phase III getestet worden.<sup>[194-196]</sup> Es werden aber auch Wirkstoffe gesucht, die gezielt die Bildung der toxischen Oligomere und deren weitere Aggregation inhibieren. Für die Entwicklung dieser Wirkstoffe ist ein detailliertes Wissen über die Struktur der toxischen Oligomere und der amyloidogenen Ablagerungen notwendig. Genauso wichtig hierfür ist es, Einblicke in die Prozesse der Umfaltung, der Assoziation und schließlich der Polymerisation des nicht toxischen Monomers zu gewinnen.



## 7.2 Struktur der Amyloide

Kennzeichnend für amyloidogene Ablagerungen sind die langen und unverzweigten Fibrillen, welche aus Protofilamenten aufgebaut sind. Gemeinsam ist ihnen die *Cross-β*-Struktur, in welcher die  $\beta$ -Faltblätter senkrecht zur Längsachse der Fibrille orientiert sind (siehe Abbildung 30 b).<sup>[197]</sup> Diverse Strukturmodelle sind für amyloidogene Fibrillen vorgeschlagen worden.<sup>[198, 199]</sup> Abbildung 31 zeigt die Einteilung in drei Modell-Klassen und veranschaulicht dabei, dass sowohl aus nativ gefalteten als auch ungefalteten Proteinen oder Proteinabschnitten Fibrillen gebildet werden können, die die charakteristische *Cross-β* Struktur besitzen. Hierbei können gleichzeitig auch einzelne Proteinabschnitte in ihrer ursprünglichen Konformation erhalten bleiben (siehe Abbildung 31 – *gain of interaction*).



**Abbildung 31:** Schematische Darstellung der drei Modelle für die Umwandlung der Proteine aus ihrer nativen in die amyloidogene Struktur; aus Nelson et al. (Copyright © 2006 Elsevier).<sup>[198]</sup> (i) Umfaltung – das Protein entfaltet sich und bildet bei der Rückfaltung die stabileren amyloidogenen Fibrillen. (ii) Nativ unstrukturiert – die Fibrillen bilden sich aus einem zuvor ungefalteten Protein (iii) Interaktionsgewinn – Segmente des Proteins gehen neue intermolekulare Wechselwirkungen ein, wobei gleichzeitig ein Teil der nativen Konformation beibehalten wird.

All diese Modelle gehen davon aus, dass das Protein vor der Fibrillenbildung in einer zumindest partiell ungefalteten Struktur vorliegt. Dies befürwortet die Hypothese, dass alle Proteine die generische Möglichkeit haben, Fibrillen zu bilden, wenn sie z.B. durch eine Veränderung im Umgebungsmilieu ihre native funktionale Konformation verlieren.<sup>[200]</sup> Die Hypothese stützt sich auf die Beobachtung, dass sowohl natürliche Proteinsequenzen als auch

artifizielle Sequenzen amyloidogene Fibrillen ausbilden, welche in ihrer Struktur nicht unterscheidbar sind. Es liegt daher nahe, dass die Struktur in amyloidogenen Fibrillen hauptsächlich durch die Triebkraft von Wasserstoffbrückenbindungen des Proteinrückgrats und nicht durch die Wechselwirkungen einzelner Aminosäureseitenketten gesteuert wird. Dennoch scheinen aber einige Schlüsselsequenzen die Amyloidbildung zu unterstützen, indem sich die Seitenketten zwischen zwei  $\beta$ -Faltblättern komplementär wie in einer Art Reisverschluss (*steric zipper*) ineinander fügen.<sup>[201]</sup> Der sequenzabhängige Interaktionsgewinn dieser hydrophoben Wechselwirkungen liefert einen zusätzlichen Beitrag zur Stabilisierung der *Cross- $\beta$* -Struktur. Die Schlüsselsequenzabschnitte lassen sich mit Hilfe von Mutationen in der Peptidsequenz ermitteln, da diese an den Kanten wesentlich besser toleriert werden als an den Flächen der sich assoziierenden  $\beta$ -Faltblätter.<sup>[202, 203]</sup>

Die meisten Untersuchungen zeigen, dass die Bildung von Fibrillen nach dem Lösen eines amyloidogenen Proteins erst mit Zeitverzögerung auftritt (siehe Abbildung 30 b).<sup>[204]</sup> Daraus lässt sich schließen, dass sich erst eine Art Polymerisationskeim bilden muss, der dann im folgenden Wachstumsprozess der Fibrille wie eine Art Faltungstemplat für die Assoziation weiterer Moleküle wirkt. Die zeitliche Verzögerung kann übersprungen werden, indem man die Proteinlösung mit fertig ausgebildeten Aggregaten des gleichen oder eines sequenzähnlichen Proteins animpft.<sup>[205]</sup>

Eine Erklärung wieso Demenz erst im hohen Alter auftritt, mag daher sein, dass hier die Wahrscheinlichkeit für Milieuschwankungen im Körper größer ist. Hierdurch können Proteine ihre funktionelle Konformation verlieren und in die toxische amyloidogene Form rückfalten. Sind erst einmal die ersten Proteine fehlgefaltet wirken diese als Keim für den Aggregationsprozess und die hieraus folgende Demenz schreitet sehr schnell fort.<sup>[200]</sup>

### **7.3 Modellpeptide zur Untersuchung der Amyloid-Aggregation**

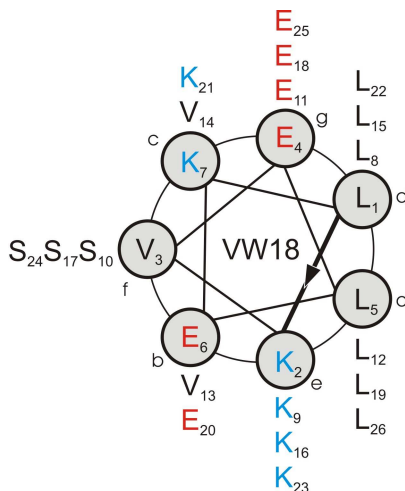
Die Untersuchung der molekularen Mechanismen der Amyloidbildung gestaltet sich oft als komplex. Zum einen sind natürliche amyloidogene Proteine synthetisch meist schwer zugänglich, werden aber für die Studien in reiner und unaggregierter Form benötigt. Außerdem erlaubt erst die synthetische Einführung von Markern die Anwendung eines breiten biophysikalischen Methodenspektrums. Zudem können die Beiträge einzelner Aminosäuren erst durch die Einführung gezielter Substitutionen (Alanin- oder Prolin-Scan) oder

Modifizierungen identifiziert werden. Um diese Komplexität zu umgehen, bedient man sich oft nur eines Fragments des relevanten Proteins. Zur Entschlüsselung der Grundprinzipien der Amyloidbildung hat sich aber vor allem die Verwendung vereinfachter Peptid-Modellsysteme bewährt. Diese sind leicht zugänglich und vor allem klein genug, um eine detaillierte Analyse des Aggregations-Prozesses zu ermöglichen.<sup>[206]</sup>

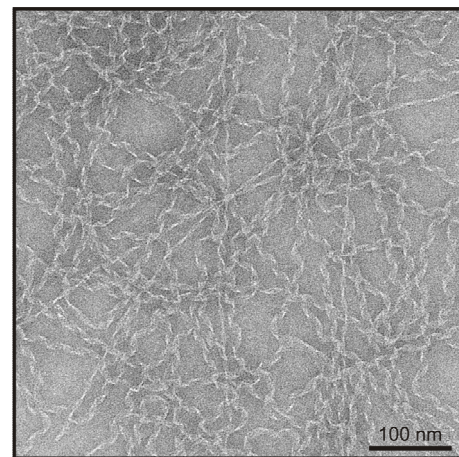
Modellsysteme, welche den Prozess der Umfaltung während der Amyloidbildung simulieren, müssen eine so genannte strukturelle Dualität besitzen. Das Peptid muss daher intrinsisch sowohl die Merkmale z.B. der  $\alpha$ -helikalen Ausgangskonformation als auch der  $\beta$ -Faltblattstruktur besitzen. Eine Destabilisierung der Ausgangskonformation allein genügt meist nicht, sondern es müssen zusätzlich gezielt Aminosäuren mit der Neigung zur  $\beta$ -Faltblattbildung eingeführt werden.<sup>[207-211]</sup> Dabei hat sich gezeigt, dass  $\beta$ -verzweigte hydrophobe Aminosäuren eine der Hauptantriebskräfte für die  $\alpha$ -zu- $\beta$  Konversion sind. Es ist aber zu berücksichtigen, dass eine ungünstige Paarung der hydrophoben Seitenketten im  $\beta$ -Faltblatt den Prozess der Selbstassoziation deutlich verlangsamen kann.<sup>[212]</sup> Viele Modellsysteme benötigen außerdem zusätzliche externe Stimuli wie Hitze<sup>[207, 212]</sup> oder pH-Wert Änderungen,<sup>[209, 213]</sup> um den Umfaltungsprozess in Gang zu setzen.

### 7.3.1 Das $\alpha$ -helikale *coiled coil* als Amyloid-Modellsystem

a.



b.



**Abbildung 32:** (a) Helical-Wheel-Darstellung des Amyloid-Modellpeptids VW18. (b) TEM-Bild von 100  $\mu$ M VW18 in Tris/HCl-Puffer (20 mM, pH 7,4, 0,025%  $\text{NaN}_3$ ) nach zweiwöchiger Inkubation.<sup>[184]</sup>

*Coiled coil*-Peptide eignen sich aufgrund ihres amphiphilen Charakters hervorragend als Modellsystem für die Amyloid-Aggregation. In der Arbeitsgruppe von Fr. Prof. Kokschi sind mehrere Peptidsequenzen entworfen worden, die in Abhängigkeit von der Zeit, der Peptidkonzentration,<sup>[208]</sup> dem pH-Wert,<sup>[209]</sup> der Metallionenkonzentration<sup>[210]</sup> oder der Anwesenheit von Nanopartikeln<sup>[214]</sup> oder künstlichen Membranen<sup>[215]</sup> Amyloide bilden. Ein Vorteil dieser Peptide ist, dass sie in einem überschaubaren Zeitraum von wenigen Stunden bis zwei Wochen von der löslichen  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Konformation in eine unlösliche amyloidogene Konformation umfalten. Des Weiteren sind sie mit einer durchschnittlichen Länge von 26 Aminosäuren synthetisch relativ einfach mittels der Festphasenpeptidsynthese zugänglich. Die Festphasenpeptidsynthese hat außerdem den Vorteil, dass nicht nur Marker eingeführt werden können sondern auch Aminosäuresubstitutionen und Seitenketten- oder Rückgratmodifikationen relativ einfach durchgeführt werden können.

Die in dieser Arbeit untersuchten Amyloid-bildenden Peptide besitzen zusätzlich zu den hydrophoben Leucinresten in den Positionen *a* und *d* der hydrophoben Wechselwirkungsdomäne drei hydrophobe Valinreste in den solvatisierten Positionen *b*, *c* und *f*. Allein diese drei zusätzlichen hydrophoben Aminosäuren genügen, um zeitabhängig eine Umfaltung der *coiled coil*-Struktur in die  $\beta$ -faltblattreiche amyloidogene Struktur zu induzieren. Dieses *coiled coil*-basierte Peptid eignet sich daher als Modell, um die Amyloidentstehung zu untersuchen. Abbildung 32 zeigt exemplarisch die *Helical-Wheel*-Darstellung des Amyloid-bildenden Peptids VW18 und dessen amyloidogene Ablagerungen nach einer Inkubation von zwei Wochen bei pH 7,4.

### 7.3.2 Amyloid-basierte Biomaterialien

Amyloid-basierte Modell-Peptide sind nicht nur ein nützliches Instrument um den Mechanismus der Amyloidbildung zu erforschen und neue Therapiestrategien zu erarbeiten, sondern sie geraten in jüngster Zeit auch verstärkt in den Fokus der Biomaterialwissenschaften und der Nanotechnologie.<sup>[216]</sup> Hier macht man sich die kontrollierte Polymerisierung durch biologisch relevante Stimuli wie pH-Wert,<sup>[217]</sup> Ionenstärke<sup>[218]</sup> und Temperatur<sup>[219]</sup> zu Nutze. Die Peptide zeigen vielversprechende Eigenschaften z.B. als Matrix für den Transport von therapeutischen Wirkstoffen oder als dreidimensionales künstliches Knorpelgewebe.<sup>[220]</sup> Sie können aber auch indirekt als Templat, z.B. zur Konstruktion von metallischen Nanodrähten, genutzt werden.<sup>[221]</sup>

## 8 DIE BEDEUTUNG VON *O*-GLYKOSYLIERUNGEN IN DER AMYLOID-AGGREGATION

### 8.1 *Chem. Eur. J.* 2010, 16, 7881-7888

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse wurden unter dem folgenden Titel im Original veröffentlicht:

- ♦ **M. Broncel, J.A. Falenski, S.C. Wagner, C.P.R. Hackenberger, B. Koksch,**  
*Chem. Eur. J.* 2010, 16, 7881-7888.

”How post-translational modifications influence amyloid formation: A systematic study of phosphorylation and glycosylation in model peptides”

Die Originalveröffentlichung ist erhältlich unter:

<http://dx.doi.org/10.1002/chem.200902452>

Die hier abgedruckte Veröffentlichung wurde mit Genehmigung des Verlages reproduziert (Copyright © 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim).

#### **Erklärung:**

Eigenleistungen an diesen Veröffentlichungen sind: Konzeption der Versuche, Peptid-design, Synthese und Charakterisierung des Glykosyl-Aminosäure-Bausteins, Peptidsynthese, Glykopeptidsynthese, ESI-MS, CD-spektroskopische Untersuchungen des Peptids und der Glykopeptide, ThT-Experimente des Peptids und der Glykopeptide, Berechnung der Molekülvolumina, Manuskriptverfassung (gleichberechtigter Erstautorenschaft mit Malgorzata Broncel).

Folgende Kooperationen sind an den Veröffentlichungen beteiligt: Malgorzata Broncel (Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin) hat die Synthese, CD-spektroskopische Untersuchungen und ThT-Experimente der phosphorylierten Peptide durchgeführt. Sara C. Wagner (Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin) hat die TEM-Bilder aufgenommen und ausgewertet.

## ZUSAMMENFASSUNG DER VERÖFFENTLICHUNG:

**„Der Einfluss von posttranslationalen Modifikationen auf die Bildung von Amyloiden: Eine systematische Studie der Phosphorylierung und Glykosylierung an Modellpeptiden“**

Die posttranslationale *O*-Glykosylierung und Phosphorylierung sind omnipräsente Proteinmodifikationen, welche an denselben Aminosäureseitenketten (Ser / Thr) stattfinden. Es gibt Anhaltspunkte, dass bei Amyloid-assoziierten Krankheiten wie z.B. der Alzheimer-Krankheit eine reziproke Beziehung zwischen diesen beiden Modifikationen besteht.

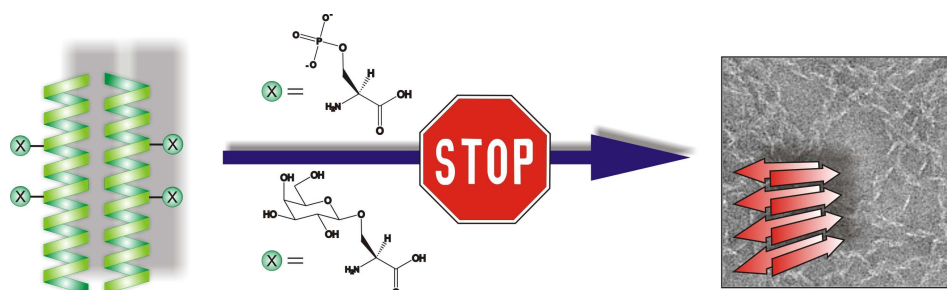
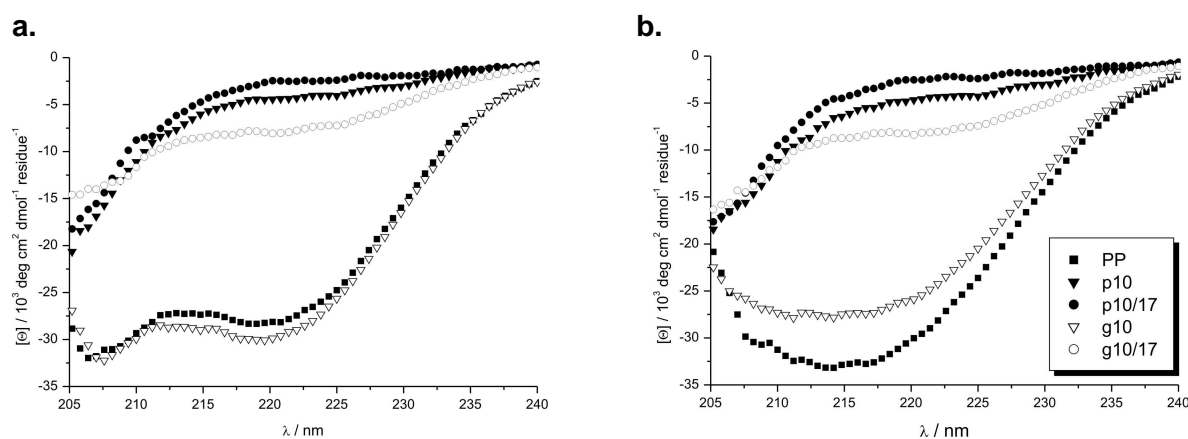


Abbildung 33: Graphische Übersicht über die Studie.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss der *O*-Glykosylierung und der Phosphorylierung auf die Amyloidbildung anhand eines *coiled coil*-basierten Modellpeptids untersucht. Hierfür wurden mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese und der *building-block*-Strategie über die Serinreste ein bis drei  $\beta$ -D-Galactosereste bzw. Phosphatreste in die dem Lösungsmittel exponierte Position *f* des *coiled coil*-Motivs eingeführt. Die Konformation der Peptide wurde zeitabhängig mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht und die Kinetik der Amyloidbildung wurde mit einem ThT-Fluoreszenz-Assay verfolgt. Nach zweiwöchiger Inkubation wurde die Morphologie der Aggregate mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht.

Die Studie zeigte, dass schon eine einzelne Phosphorylierung eines 26 Aminosäuren langen Peptids die Faltung in eine *coiled coil*-Struktur verhindert. Alle phosphorylierten Peptide lagen zeitunabhängig ungefaltet vor und es waren keinerlei Anzeichen für eine Amyloidbildung zu detektieren. Im Gegensatz hierzu zeigten die verschiedenen Glykopeptide deutliche Unterschiede in ihrem Faltungsverhalten. Die Einführung eines einzelnen  $\beta$ -D-

Galactoserests hatte einen geringen Einfluss auf die anfängliche *coiled-coil*-Konformation. Allerdings wurde die Fibrillenbildung bei Peptid g10 deutlich verlangsamt, wobei die Morphologie der gebildeten Fibrillen der des unmodifizierten Basis-Peptids ähnelte. Peptid g17, welches sich von g10 allein in der Position der *O*-Glykosylierung unterscheidet, zeigte hingegen keine zeitliche Verzögerung bei der Amyloidbildung. Die Einführung von weiteren  $\beta$ -D-Galactoseresten (Peptid g10/17 und g10/17/24) resultierte allerdings auch hier in einer ungeordneten Peptidkonformation. Diese mehrfach glykosylierten Peptide bildeten wie die phosphorylierten Peptide keine Amyloide und blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum ungefaltet.



**Abbildung 34:** CD-Spektren von 100  $\mu\text{M}$  Peptidlösungen des Basis-Peptids PP und der phosphorylierten (p10, p10/17) und glykosylierten (g10, g10/17) Peptide unmittelbar nach dem Lösen der Peptide (a) und nach zwei Wochen Inkubation (b) in Tris/HCl-Puffer (20 mM, pH 7,4, 0,025%  $\text{NaN}_3$ ).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Amyloidbildung durch eine einzelne Phosphorylierung bzw. multiple *O*-Glykosylierung von Serinresten inhibiert werden kann. Zudem ist der Einfluss der *O*-Glykosylierung von der Position im Peptidrückgrat abhängig. Interessanterweise werden nur Amyloide gebildet, wenn das Peptid zuvor in der *coiled coil*-Konformation vorliegt. Dies lässt vermuten, dass es bedingt durch die Oligomerisierung der Helices zu einer erleichterten Amyloidkeimbildung kommt.<sup>[222, 223]</sup> Denn durch die Oligomerisierung der Helices wird die lokale Peptidkonzentration erhöht und gleichzeitig werden die Peptidstränge vororientiert, sodass die Energiebarriere für den initialen Schritt der Amyloidbildung minimiert ist. Zudem ist die Bildung von Amyloiden aus einer anfänglich rigiden gefalteten Struktur mit einem geringeren Verlust der Konformationsentropie verbunden.

## 9 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Fragestellungen bearbeitet, die sich mit der Faltung von  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Peptiden beschäftigen, beziehungsweise das *coiled coil*-Motiv als Modellsystem für die Proteinfaltung nutzen.

In **Teil 1** dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Wasserstoffbrückenbindungen im Peptidrückgrat auf die Strukturbildung und Stabilität von Proteinen systematisch untersucht. Hierbei diente das  $\alpha$ -helikale *coiled coil*-Motiv als Modellsystem, da es sowohl eine hydrophobe als auch eine hydrophile Erkennungsdomänen besitzt. Amid-zu-Ester-Substitutionen ermöglichten es, gezielt einzelne Wasserstoffbrückenbindungen des Peptidrückgrats zu eliminieren. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurden die Faltung und die Stabilität von sechs Depsipeptidvarianten bestimmt und mit der des nativen Peptids verglichen. Parallel hierzu wurden Moleküldynamik-Simulationen durchgeführt. Die Amid-zu-Ester-Substitutionen wurden sowohl terminal als auch mittig der Peptidsequenz in den hydrophoben und hydrophilen Positionen des *coiled coil*-Motivs eingeführt. Die thermodynamische Auswertung zeige, dass der Einfluss der Wasserstoffbrücken auf die Proteinfaltung in großem Maße von der jeweiligen Umgebung abhängt. Sind die an der Wasserstoffbrückenbindung beteiligten Funktionen bzw. deren Bindungspartner dem Lösungsmittel exponiert, besteht wie im ungefalteten Protein die Möglichkeit zu Wasserstoffbrückenbindungen mit den Lösungsmittelmolekülen. Aufgrund dieser Konkurrenzsituation sind die solvatisierten Wasserstoffbrücken des Peptidrückgrats für die Strukturstabilisierung nicht so essentiell wie die Wasserstoffbrückenbindungen in der hydrophoben Kernstruktur, denn der energetische Beitrag der Wasserstoffbrücken an der Proteinfaltung wird nicht durch die Anzahl der Wasserstoffbrücken bestimmt. Schließlich sind alle Wasserstoffbrückendonatoren und -akzeptoren des Proteinrückgrats vor der Faltung schon in Wasserstoffbrücken mit den Wassermolekülen involviert. Daher ist allein die Differenz der Stärke zwischen Protein-Wasser- bzw. Protein-Protein-Wasserstoffbrücken für die Proteinfaltung ausschlaggebend. Die Experimente zeigen, dass die Eliminierung einer einzelnen Wasserstoffbrücke in hydrophober Umgebung zu einer gravierenden Destabilisierung der *coiled coil*-Struktur führt. Demzufolge lässt sich schlussfolgern, dass Wasserstoffbrücken in einem hydrophoben Milieu wesentlich stärker sind und damit von größerer Bedeutung sind. Alle experimentellen Ergebnisse stehen in sehr guter Übereinstimmung mit den *in silico* durchgeführten Moleküldynamik-Simulationen.



Kürzlich wurde von Gao *et al.* eine Studie vorgestellt, die zu dem gleichen Schluss kommt.<sup>[17]</sup> Sie führten thermodynamische Analysen mit einer Reihe von Doppelmutanten durch, bei denen Sie zum einen ebenfalls Amid-zu-Ester-Substitutionen zur Eliminierung von Wasserstoffbrücken nutzten. Zum anderen führten sie in Nachbarposition zu diesen Substitutionen jeweils eine hydrophobe Aminosäure ein, um eine weniger polare Mikroumgebung zu schaffen. Als Testsystem nutzten sie sowohl die helixreiche B-Domäne des Proteins A von *Staphylococcus aureus* als auch die  $\beta$ -faltblattreiche WW-Domäne des menschlichen PIN1 Proteins. Sie zeigten, dass eine Abnahme der Polarität der Mikroumgebung sowohl im helix- als auch  $\beta$ -faltblattreichen Testsystem die Stärke der Wasserstoffbrückenbindung um bis zu  $1,2 \text{ kcal mol}^{-1}$  erhöhen kann.

Das Verständnis dieser kontextabhängigen Stärke der Wasserstoffbrücken ist für eine Reihe von Problemen wie der Vorhersage der Proteinstruktur sowie dem Protein *Engineering* und dem Protein Design von großer Bedeutung.

**Teil 2** dieser Arbeit adressierte den Einfluss von multiplen *O*-Glykosylierungen auf die Konformation und Stabilität der  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Struktur. Hierfür wurden in eine 26 Aminosäuren lange Peptidsequenz systematisch ein bis sechs  $\beta$ -D-Galactosereste über die Serinseitenketten in den Positionen *b*, *c* und *f* eingeführt. Die Konformation aller Glykopeptide wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht und deren Stabilitäten wurden über die temperaturinduzierte Denaturierung bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass in den *de novo* entwickelten *coiled coil*-Peptiden selbst die multiple Glykosylierung der solvensexponierten Domäne keinen Einfluss auf die Faltung hat. Die Denaturierungsexperimente offenbarten lediglich eine geringe sukzessive Destabilisierung mit zunehmender Glykosylierung der *coiled coil*-Struktur.

Die Studie zeigte, dass die *O*-Glykosylierung mit  $\beta$ -D-Galactose ohne gravierende Stabilitätsverluste toleriert wird und das *coiled coil*-Faltungsmotiv daher großes Potential als multivalente Gerüststruktur hat. Aufgrund der geometrischen Vorgabe des *Heptad*-Wiederholungsmusters können die Liganden in einem definierten Abstand zueinander präsentiert werden. Um weite Rezeptorabstände zu überbrücken und die Valenz des *coiled coil*-basierten Gerüsts zu erhöhen, wurde ein faserbildendes *coiled coil*-System entwickelt. Dieses besitzt eine einheitliche, aus Lysinresten bestehende elektrostatische Wechselwirkungsdomäne (Positionen *e* und *g*), die ein Überlappen der Helices ermöglicht. Zuvor wurde in einer

systematischen Untersuchung der Seitenkettenlänge basischer Aminosäuren in den Positionen *e* und *g* gezeigt, dass *coiled coil*-Peptide trotz dieser einheitlich geladenen Domäne durch lange aliphatische Seitenkettenanteile, wie z.B. die (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-Einheit beim Lysin, eine stabile Struktur ausbilden können.

Die hier vorgestellten Ergebnisse beschreiben die systematische Entwicklung einer multivalenten *coiled coil*-basierten Gerüststruktur. In weiterführenden Experimenten muss jetzt unter anderem die Proteasestabilität dieser Gerüste und vor allem die Bindung an natürliche Glykorezeptoren getestet werden. Hierfür bieten sich vor allem Rezeptoren an, welche spezifisch an terminale β-Galactosereste binden. So könnten Interaktionen mit Lektinen (wie z.B. dem Peanut Agglutinin oder dem Erythrina Cristagalli Lektin) mit Hilfe von SPR-Experimenten untersucht werden. Ein anderer interessanter Rezeptor ist der Asialoglykoprotein-Rezeptor. Dieser wird von HepG2-Zellen, einer hepatozellulären Krebszelllinie, hoch exprimiert. Mit der Hilfe der Durchflusszytometrie kann die Aufnahme in die HepG2-Zellen analysiert werden. Nach den primären biologischen Tests sollte eine anwendungsspezifische Optimierung der multivalenten Gerüststruktur erfolgen. Diese kann aus einer Variation der Ligandenabstände oder der Einführung von flexiblen Linkern bestehen. Die Variation in den Ligandenabständen kann zum einen über die direkte synthetische Einführung der Liganden in unterschiedlichen Positionen des *coiled coil*-Motivs erfolgen. Eine andere Möglichkeit eröffnet das in dieser Arbeit vorgestellte heteromere System, welches aus einem glykosylierten und einem unglykosylierten faserbildenden *coiled coil*-Peptid besteht. Durch das Mischen dieser beiden Peptide erhält man je nach gewähltem Mischungsverhältnis eine unterschiedliche statistische Verteilung der Liganden entlang der *coiled coil*-Nanofaser. Des Weiteren wäre es interessant, die Eignung der *coiled coil*-basierten Gerüststruktur für den Einsatz anderer Liganden zu testen.

In **Teil 3** dieser Arbeit wurde der Einfluss der *O*-Glykosylierung und der Phosphorylierung auf die Amyloidaggregation systematisch anhand eines *coiled coil*-basierten Modellsystems untersucht. Dieses Thema ist von großem Interesse, da das vermehrte Auftreten neurodegenerativer Krankheiten, wie z.B. der Alzheimer-Krankheit, mit der erhöhten Lebenserwartung der Bevölkerung in den Industrieländern ein zunehmendes Problem darstellt. Die posttranslationale *O*-Glykosylierung und Phosphorylierung sind omnipräsente Proteinmodifikationen, welche an denselben Aminosäureseitenketten (Ser / Thr) stattfinden. Es gibt

vermehrte Anhaltspunkte, dass bei Amyloid-assoziierten Krankheiten eine reziproke Beziehung zwischen diesen beiden Modifikationen besteht. In der hier vorgestellten Studie wurden mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese und der *building-block*-Strategie ein bis drei  $\beta$ -D-Galactosereste bzw. Phosphatreste über die Serinreste in Position *f* des *coiled coil*-Motivs eingeführt. Die Konformation der Peptide wurde zeitabhängig mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht und die Kinetik der Amyloidbildung mit einem ThT-Fluoreszenz-Assay verfolgt. Die Untersuchung der Morphologie der Aggregate erfolgte mittels TEM.

Die Ergebnisse zeigen übereinstimmend, dass alle phosphorylierten Peptide zeitunabhängig ungefaltet vorlagen und keinerlei Anzeichen für eine Amyloidbildung zu detektieren waren. Im Gegensatz hierzu zeigten die verschiedenen Glykopeptide deutliche Unterschiede in ihrem Faltungsverhalten. Die Einführung eines einzelnen  $\beta$ -D-Galactoserests hatte keinen Einfluss auf die anfängliche *coiled-coil*-Konformation. Allerdings wurde die Fibrillenbildung bei Peptid g10 deutlich verlangsamt, wobei die Morphologie der gebildeten Fibrillen der des unmodifizierten Basis-Peptids ähnelte. Peptid g17, welches sich von g10 allein in der Position der *O*-Glykosylierung unterscheidet, zeigte hingegen keine zeitliche Verzögerung bei der Amyloidbildung. Der Einfluss der Glykosylierung auf die Amyloidbildung ist demzufolge positionsabhängig. Die Einführung von weiteren  $\beta$ -D-Galactoseresten (Peptid g10/17 und g10/17/24) resultierte allerdings auch hier in einer ungeordneten Peptidkonformation. Diese mehrfach glykosylierten Peptide bildeten wie die phosphorylierten Peptide keine Amyloide und blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum ungefaltet. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die Amyloidbildung durch eine einzelne Phosphorylierung bzw. multiple *O*-Glykosylierung der Serinreste inhibiert werden kann. Interessanterweise wurden nur Amyloide detektiert, wenn das Peptid zuvor in der gefalteten *coiled coil*-Konformation vorlag. Dies lässt vermuten, dass es, bedingt durch die Oligomerisierung der Helices, zu einer lokalen Konzentrationserhöhung kommt, welche die Amyloidaggregation auslöst. Zudem ist die Bildung von Amyloiden aus einer anfänglich rigiden gefalteten Struktur mit einem geringeren Verlust der Konformationsentropie verbunden.

In weiterführenden Experimenten wäre es interessant zu untersuchen, ob die Natur des Zuckers einen Einfluss auf die Amyloidbildung hat. In der hier präsentierten Studie diente das Monosaccharid  $\beta$ -D-Gal, welches als terminaler Zuckerrest in Glykanen weit verbreitet ist, als einfaches Modell für *O*-glykosidisch gebundene Zucker. Es liegt daher nahe, analoge Studien

mit z.B. GlcNAc oder komplexeren Glykanen zu unternehmen. Des Weiteren bietet es sich an, Fragmente biologisch relevanter Amyloid-bildender Proteine, wie z.B. das A $\beta$ -Peptid, gezielt zu glykosylieren und die Auswirkungen auf die Aggregation und Toxizität zu testen.

## 10 METHODEN ZUR STRUKTURBESTIMMUNG VON PROTEINEN

Die Entschlüsselung der Primärstruktur eines Proteins stellt mit den heute zur Verfügung stehenden Sequenzierungstechniken keine große Herausforderung mehr dar. Im Gegensatz hierzu gestaltet sich die Ermittlung der genauen dreidimensionalen Struktur von Proteinen oftmals als sehr komplex. Die Methode der Wahl ist die Proteinkristallographie, welche die atomare Struktur liefert. Allerdings ist die Kristallisation meist mit einem sehr hohen Zeit- und Materialaufwand verbunden und oftmals gelingt die Kristallisation der Proteine überhaupt nicht. Es gibt aber eine Vielzahl von weiteren etablierten Methoden, alle mit ihren Vor- und Nachteilen, die in Kombination ein sehr nützliches Hilfsmittel zur Aufklärung von Proteinstrukturen sein können. Die verschiedenen Methoden beleuchten diverse Aspekte der Gesamtstruktur der Proteine, wie z.B. die Größe, die Sekundärstruktur und die Oligomerisierung. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die gebräuchlichsten Methoden zur Proteinstrukturcharakterisierung. Die Methoden, die in dieser Arbeit zur Anwendung kamen, werden im Anschluß ausführlich besprochen.

**Tabelle 3:** *Methoden zur Proteinstrukturcharakterisierung.*

<b>Methode</b>	<b>Beschreibung und Anwendung</b>
<i>AFM</i>	<i>Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy)</i> – AFM liefert, abhängig von der Funktionalisierung der Nadel, Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit aber auch über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen sowie Bindungskräfte zwischen Molekülen.
<i>CD</i>	<i>Circulardichroismus-Spektroskopie</i> – Diese spektroskopische Methode liefert charakteristische Signale für Sekundärstrukturelemente wie z.B. $\alpha$ -Helices oder $\beta$ -Faltblätter, da links bzw. rechts zirkular polarisiertes Licht von chiralen Molekülen und Strukturen unterschiedlich stark absorbiert wird. Siehe Abschnitt 10.1.
<i>DLS</i>	<i>Dynamische Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering)</i> – Ein monochromatischer Laserstrahl wird durch eine Lösung geschickt. Die Brown'sche Bewegung der darin gelösten Partikel induziert aufgrund des Dopplereffekts eine Änderung in der Wellenlänge. Aus dieser Verschiebung lässt sich der Diffusionskoeffizient und der damit verbundene hydrodynamische Radius der Moleküle bestimmen.

<b>Methode</b>	<b>Beschreibung und Anwendung</b>
<i>EPR</i>	<i>Elektronenspinresonanz (Electron Paramagnetic Resonance)</i> – Die Anwendung der EPR-Spektroskopie ist auf paramagnetische Proben limitiert. Sie wird daher in biologisch relevanten Molekülen hauptsächlich zur Bestimmung der Koordinationssphäre von Metallionen herangezogen.
<i>Fluoreszenz-Spektroskopie</i>	Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine sehr sensible Methode, die selbst Änderungen der lokalen Umgebung des Fluorophors registriert. Durch die Inkorporation von geeigneten Fluoreszenzmarkern in die Proteinsequenz lassen sich u.a. Informationen über die Anordnung oder Struktur von Proteinen sowie deren Interaktion gewinnen.
<i>IR</i>	<i>Infrarot-Spektroskopie</i> – Hier werden Änderungen in der Schwingungsfrequenz genutzt, um Informationen über die Sekundärstruktur zu erhalten.
<i>Massen Spektrometrie</i>	Die sanften Ionisierungsmethoden MALDI und ESI erlauben die präzise Massenbestimmung von Makromolekülen, ohne dass diese fragmentieren. Hiermit lassen sich selbst nicht kovalent gebundene Komplexe identifizieren.
<i>NMR</i>	<i>Kernspinresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)</i> – Neben der Röntgenkristallographie ist die Kernspinresonanzspektroskopie die einzige Methode, um Strukturen auf atomarer Ebene aufzuklären. Darüber hinaus erlaubt sie, dynamische Prozesse wie die Proteinfaltung oder Reaktionskinetiken zu verfolgen.
<i>SEC</i>	<i>Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography)</i> – Hier werden die Moleküle mittels eines porösen Trenngels anhand ihrer Masse und Form getrennt. Siehe Abschnitt 10.3.
<i>TEM</i>	Die <i>Transmissionselektronenmikroskopie</i> ist ein bildgebendes Verfahren, bei dem in Analogie zur Lichtmikroskopie die Wellennatur der Elektronen genutzt wird. Es sind Vergrößerungen zwischen 100-fach und 800 000-fach einstellbar. Siehe 10.5.
<i>AUZ</i>	<i>Analytische Ultrazentrifugation</i> – Hier wird die Sedimentation von Makromolekülen in einem Zentrifugalfeld beobachtet. Hieraus lassen sich Informationen über die Molekularmasse dieser Moleküle, aber auch die Selbst- oder Heteroassoziation oder Gleichgewichtsverteilungen ermitteln. Siehe Abschnitt 10.4.

---

Methode	Beschreibung und Anwendung
XAS	<i>Röntgenabsorptionsspektroskopie (X-Ray Absorption Spectroscopy)</i> – Bei der Absorption von Röntgenstrahlung werden Elektronen aus den inneren Orbitalen (1s, 2s, 2p) angeregt. Die Feinstruktur kann Informationen über die Umgebung von biologisch relevanten Schweratomen in Proteinen liefern.
<i>Röntgenstrukturanalyse</i>	Die Röntgenstrukturanalyse ist die Methode der Wahl, um die atomare Struktur von Proteinen aufzuklären. Im Kristall wird die Röntgenstrahlung an den Elektronen der Atome gebeugt und anhand des Beugungsmusters kann die dreidimensionale Struktur berechnet werden.

## 10.1 Circular dichroismus-Spektroskopie

Ein Molekül, das nicht mit seinem Spiegelbild zu Deckung gebracht werden kann, ist chiral (griech. *cheir* „Hand“). Solche Moleküle sind optisch aktiv, da sie die Polarisations Ebenen von linear polarisiertem Licht drehen. Bei den makromolekularen Proteinen wird die optische Aktivität aber nicht maßgeblich durch die Chiralität der einzelnen Aminosäuren, sondern durch deren Sekundärstruktur bestimmt. Denn auch Strukturelemente wie z.B. die rechtsgängige  $\alpha$ -Helix sind chiral. Diese Tatsache kann man sich zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen zunutze machen.

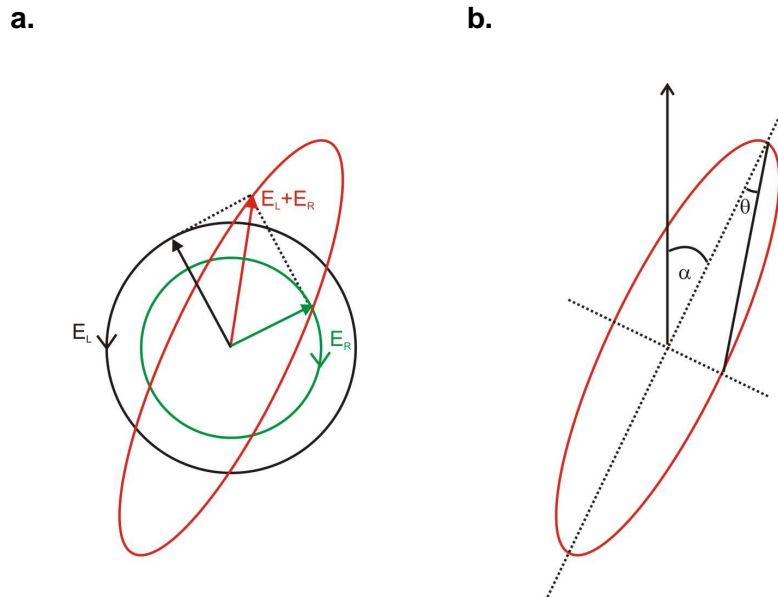
### 10.1.1 Physikalischer Hintergrund

In der Circular dichroismus-Spektroskopie (CD) wird die Differenz der Absorptionskoeffizienten für links und rechts zirkular polarisiertes Licht ( $\epsilon_L$  bzw.  $\epsilon_R$ ) gemessen. Die Differenz kommt dadurch zustande, dass in optisch aktiven Substanzen die Lichtgeschwindigkeit für links und rechts zirkular polarisierte Strahlung unterschiedlich groß ist. Daher haben optisch aktive Substanzen verschiedene Brechungsindizes für die unterschiedlich polarisierten Lichtwellen. Dieser Effekt wird als optische Rotationsdispersion bezeichnet. Mit der Differenz der beiden Brechungsindizes geht eine Differenz der Absorptionsintensitäten  $A_R$  und  $A_L$  für rechts bzw. links zirkular polarisiertes Licht einher. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz folgt:

$$\Delta A = A_L - A_R = \epsilon_L \cdot c \cdot l - \epsilon_R \cdot c \cdot l = \Delta \epsilon \cdot c \cdot l$$

G- 3

Aus historischen Gründen wird aber anstelle der Absorptionsdifferenz auch heute noch die Elliptizität  $\theta$  in *degree* angegeben. Die optisch aktive Probe wandelt nämlich das rechts und links zirkular polarisierte Licht durch die unterschiedliche Amplitudenabnahme der beiden Lichtwellen in elliptisch polarisiertes Licht um.  $\theta$  ist hierbei der Winkel zwischen der Haupt- und Nebenachsen der Ellipse.



**Abbildung 35:** a) Die unterschiedlich starke Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht resultiert aus der Addition der beiden elektrischen Feldvektore in elliptisch polarisiertem Licht. b) Definition der Elliptizität durch den Winkel  $\theta$  und der optischen Aktivität durch den Winkel  $\alpha$ .

$$\theta(\text{deg}) = \ln 10 \cdot 180 \cdot \frac{\Delta A}{4\pi} = 32,98 \Delta A \quad \text{G- 4}$$

Die molare Elliptizität  $[\theta]$  mit der Einheit  $10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1} \text{ residue}^{-1}$  berücksichtigt die molare Konzentration der Probe ( $c$  in  $\text{mol l}^{-1}$ ), die Schichtdicke der Küvette ( $l$  in  $\text{cm}$ ) und die Anzahl der Aminosäurereste ( $n$ ). Diese Normierung ermöglicht einen einfachen Vergleich verschiedener Spektren.

$$[\theta] = \frac{\theta}{10000 \cdot c \cdot l \cdot n} \quad \text{G- 5}$$

Der Unterschied in den Absorptionskoeffizienten bei der CD-Spektroskopie ist sehr klein. Er liegt oft bei weniger als einem tausendstel des Absorptionskoeffizienten. Daher gestaltet sich



die Messtechnik für die CD-Spektroskopie etwas aufwändiger: Durch einen Monochromator wird Licht einer Wellenlänge  $\lambda$  erzeugt und anschließend linear polarisiert. Unter dem Einfluss eines hochfrequenten elektrischen Wechselfeldes erzeugt ein Modulator eine links- und eine rechtszirkular polarisierte Lichtwelle. Ein synchron dazu geschalteter Detektor registriert alternativ die Absorptionsintensitäten  $A_L$  oder  $A_R$ . Daraus kann die Elliptizität  $\theta$  berechnet und bei Variation der Wellenlänge ein CD-Spektrum aufgenommen werden (siehe Abbildung 36).

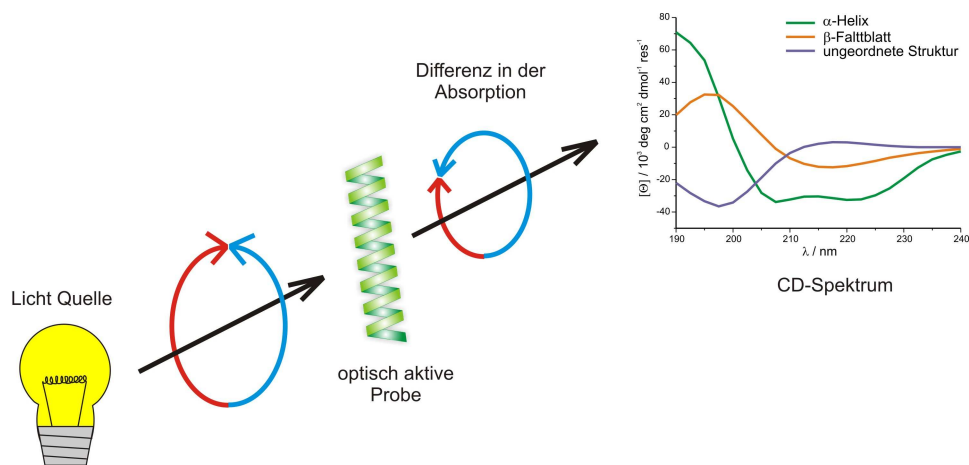


Abbildung 36: Schematischer Aufbau eines CD Experiments.

### 10.1.2 Proteinstrukturanalyse

Die Untersuchungen von Proteinstrukturen mit hochauflösenden Methoden wie der Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie sind mit einem hohen präparativen Aufwand verbunden. Die Röntgenstrukturanalyse setzt die Kristallisierbarkeit der zu untersuchenden Proteine voraus, was sich oft als schwierig und zeitaufwändig herausstellt. Für die NMR-Spektroskopie werden meist sehr hohe Probenkonzentrationen benötigt. Dies ist ein Problem, da die Verfügbarkeit sehr eingeschränkt ist und viele Proteine außerdem bei hohen Konzentrationen zur Aggregation neigen. Zudem können nur Proteine mit einem Molekulargewicht von weniger als 50.000 Da untersucht werden. Beide Methoden ermöglichen die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen, wobei die NMR-Spektroskopie zusätzliche Informationen zur Dynamik im Bereich von Millisekunden liefern kann. Die CD-Spektroskopie ist besonders für die Untersuchung von Konformationsänderungen von Proteinen und Peptiden geeignet, da die Messungen sehr schnell durch-

führbar und die experimentellen Bedingungen wie Konzentration oder Temperatur vergleichsweise wenig limitiert sind.

Meist wird der Spektralbereich von 160 bis 250 nm untersucht. Hier liegen die  $n \rightarrow \pi^*$ - und die  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge der Peptidbindung. Aufgrund der Chiralität der Sekundärstrukturen erhält man charakteristische CD-Spektren die in Abbildung 36 zu sehen sind. Eine rechtshändige  $\alpha$ -Helix eines Peptids zeigt im CD-Spektrum ein charakteristisches Maximum bei 190 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang) und zwei Minima bei 206 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang) und 222 nm ( $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang). Das Verhältnis der Elliptizitäten der beiden Minima ( $\Theta_{222}/\Theta_{208}$ ) liefert wichtige Informationen über den Oligomerisierungsgrad der  $\alpha$ -Helices. Werte um 1,0 zeigen das Vorliegen von  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Dimer an, wohingegen Werte um 0,8 auf isolierte  $\alpha$ -Helices hindeuten.<sup>[48, 224]</sup> Wenn das zweite Minimum bei 222 nm absinkt, während das bei 208 nm konstant bleibt, ist dies ein Hinweis auf die Bildung von  $\alpha$ -helikalen *coiled coil*-Oligomeren.<sup>[180]</sup> Eine  $\beta$ -Faltblattstruktur ist an einem Maximum bei 195 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang) und einem Minimum bei 215 nm bis 220 nm ( $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang) zu erkennen. Selbst eine ungeordnete Peptidstruktur hat ein charakteristisches Spektrum mit einem Minimum bei 198 nm. Anhand der CD-Spektroskopie können allerdings nur gemittelte Angaben zur Struktur getroffen und bestimmten Regionen im Protein keine strukturellen Motive zugeordnet werden. Um die Sekundärstruktur eines Peptids zu analysieren, passt man dem CD-Spektrum mathematisch eine Linearkombination von Beiträgen des CD-Spektrums einer reinen  $\alpha$ -Helix (H), eines reinen  $\beta$ -Faltblatts ( $\beta$ ) und einer reinen Knäuelstruktur (R) an.<sup>[225]</sup>

$$[\theta] = f_H \theta + f_\beta \theta + f_R \theta \quad \text{G- 6}$$

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Berechnung der helikalen Strukturanteile der Peptide eine vereinfachte Näherung nach Chen *et al.* verwendet, welche das charakteristische CD-Signal bei 222 nm nutzt.<sup>[225]</sup> Diese berücksichtigt die Abhängigkeit des CD-Signals von der Länge der Helix wie folgt:

$$[\theta_H^n] = [\theta_H^\infty] \cdot \left(1 - \frac{k}{n}\right) \quad \text{G- 7}$$

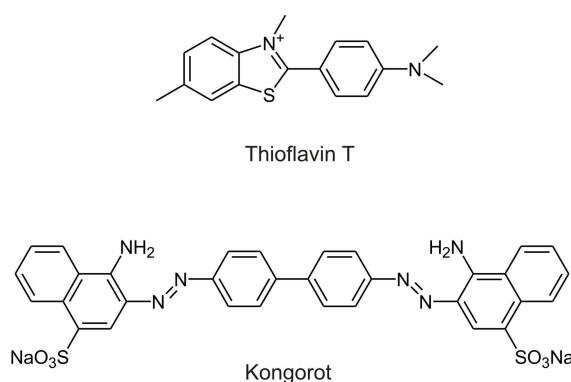
wobei  $[\theta]_H^\infty$  der Referenzwert für eine Helix unendlicher Länge,  $n$  die Anzahl an Aminosäureresten und  $k$  eine wellenlängenabhängige Konstante ist. Durch das Einsetzen der Konstanten für 222 nm ergibt sich folgender Ausdruck, der den molaren Elliptizitätswert für eine 100 %  $\alpha$ -helikal gefaltete Struktur angibt.

$$[\theta_{222nm}^n] = -39500 \cdot \left(1 - \frac{2,57}{n}\right) \quad \text{G-8}$$

## 10.2 ThT-Fluoreszenz

Die CD-Spektroskopie ist zwar eine gute Methode, um Konformationsänderungen von ungeordneten oder  $\alpha$ -helikalen Strukturen hin zu  $\beta$ -Faltblattstrukturen zu verfolgen, aber sie liefert keine Informationen über den Grad der Aggregation dieser  $\beta$ -Faltblätter.

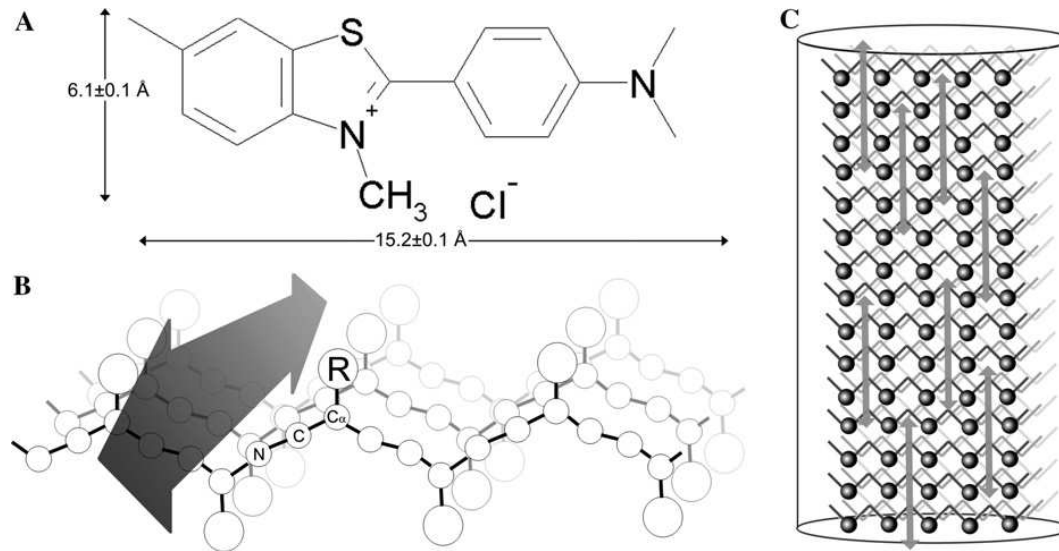
Es ist bekannt, dass einige ebene aromatische Moleküle wie z.B. Kongorot und Thioflavin T (ThT) spezifisch an amyloidogene  $\beta$ -Faltblattstrukturen binden. Die Färbung bzw. Fluoreszenz solcher Moleküle kann zum einen zur Identifizierung der amyloidogenen Aggregate, aber auch zu deren Quantifizierung genutzt werden. Die Farbstoffe und Fluorophore werden zum Anfärben von histologischen Proben,<sup>[226, 227]</sup> zum *in vivo* Amyloid-Imaging,<sup>[228]</sup> und als Leitstruktur zur Entwicklung neuer Therapeutika genutzt.<sup>[229]</sup>



**Abbildung 37:** Lewis-Strukturformeln von Thioflavin T und Kongorot.

Das Fluorophor Thioflavin T kann dazu genutzt werden, die Amyloid-Aggregation zeitabhängig zu verfolgen. Das ungebundene ThT-Molekül hat bei einer Wellenlänge von 350 nm sein Anregungsmaximum und bei 450 nm sein Emissionsmaximum. Bindet das Molekül

allerdings an amyloidogene Aggregate, verschieben sich Anregungsmaximum und Emissionsmaximum auf  $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 485 \text{ nm}$  und die Fluoreszenzintensität steigt drastisch an. Durch Messung dieser Fluoreszenz ist es daher möglich, innerhalb einer Versuchsreihe die relative Menge an amyloidogenen Aggregaten anhand der Intensität zu quantifizieren. Die zeitabhängige Messung erlaubt zudem die Verfolgung der Aggregationskinetik in Lösung.



**Abbildung 38:** a) Strukturformel und Abmessungen des Thioflavin T Moleküls. b) Modell der ThT-Bindung an ein  $\beta$ -Faltblatt mit Rückgratatomen (N, C,  $C_\alpha$ ) und Seitenketten (R). Der Doppelpfeil deutet die Position des Thioflavin T Moleküls in den parallel zur Fibrillenachse liegenden Hohlräumen des  $\beta$ -Faltblattes an. c) Schematische Darstellung eines Protofilaments mit gebundenen ThT-Molekülen. Die dem Lösungsmittel zugänglichen Seitenketten sind als schwarze Kugeln dargestellt. Die als Doppelpfeil dargestellten ThT-Moleküle liegen in den Kanälen dieser Protofilamente. Aus Krebs et al. (Copyright © Elsevier).<sup>[230]</sup>

Der Mechanismus der ThT-Bindung und der Fluoreszenzverschiebung ist noch nicht vollkommen aufgeklärt. Die Primärstruktur der Proteine und Peptide ist nicht ausschlaggebend, da die charakteristische Fluoreszenz bei unterschiedlichsten Sequenzen auftritt und zudem keine Fluoreszenzverschiebung bei der Inkubation mit Monomeren beobachtet wird. Gemeinsam ist allen amyloidogenen Strukturen allerdings die charakteristische *Cross- $\beta$* -Struktur, bei der die  $\beta$ -Faltblätter senkrecht zur Fibrillenachse angeordnet sind. Einige Studien geben Hinweise darauf, dass sich die ThT-Moleküle in den parallel zur Fibrillenachse befindlichen länglichen Hohlräumen der Fibrillen einlagern (siehe Abbildung 38). Für die charakteristische Fluoreszenz scheint hierbei nicht die Proteinumgebung des Hohlraums, sondern dessen Größe entscheidend zu sein. Nach

Groenning *et al.* müssen diese Hohlräume einen Durchmesser von mindestens 8-9 Å und eine Länge von 15,2 Å besitzen, damit darin mindestens zwei ThT-Moleküle Platz finden.<sup>[231]</sup> Sie konnten zeigen, dass  $\beta$ -Faltblatt-arme Strukturen (wie z.B.  $\gamma$ -Cyclodextrin und Acetylcholinesterase) Hohlräume ähnlicher Abmessung wie jene in der *Cross- $\beta$* -Struktur besitzen.<sup>[232]</sup> Sie sind ebenfalls in der Lage, die charakteristische ThT-Fluoreszenz zu induzieren. Im Gegensatz hierzu konnte bei dem  $\beta$ -faltblattreichen Transthyretin kein charakteristisches Fluoreszenzsignal beobachtet werden, da der Durchmesser des Hohlraums zu klein ist, um zwei ThT-Moleküle aufzunehmen. Diese Beobachtungen lassen schlussfolgern, dass die Dimerisierung von ThT-Molekülen in Proteinhohlräumen geeigneter Größe ausschlaggebend für die charakteristische ThT-Fluoreszenz ist. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese der Excimer-Bildung von ThT in  $\gamma$ -Cyclodextrin<sup>[233]</sup> und in der DNA.<sup>[234]</sup> Die Erweiterung des konjugierten Systems bei der Excimer-Bildung ist üblicherweise mit einer Rotverschiebung im Fluoreszenzsignal verbunden, welche auch bei der charakteristischen ThT-Fluoreszenz beobachtet wird. Neueste Studien haben gezeigt, dass durch Polyethylenglycol verbundene ThT-Dimere eine gesteigerte Affinität gegenüber A $\beta$ <sub>40</sub>-Fibrillen haben.<sup>[235]</sup> Dennoch ist der Mechanismus der Diffusion von ThT-Molekülen in die Hohlräume der Fibrille noch unklar.

## 10.3 Größenausschlusschromatographie

Das Prinzip der Größenausschlusschromatographie beruht auf der unterschiedlichen Permeation der Moleküle in ein poröses Trägermaterial mit definierter Porengröße. Kleine Moleküle bewegen sich weitgehend ungehindert zwischen der Matrix der stationären Phase und dringen weit in die Porenkanäle ein. Dadurch erfahren sie eine starke Verzögerung bei der Elution. Ab einer bestimmten Molekülgröße können diese nicht mehr in die Poren eindringen und eluieren zusammen mit der Lösungsmittelfront im Ausschussvolumen  $V_0$ . Die kleinsten Moleküle haben somit die längste Aufenthaltsdauer auf der Säule und werden zuletzt eluiert (siehe Abbildung 39). Die Größenausschlusschromatographie wird für präparative Zwecke wie zum Aufreinigen von Proteinen und deren Entsalzung genutzt. Sie wird aber auch in der Analytik zur Bestimmung des Molekulargewichts und des Oligomerisierungsgrades oder für Bindungsstudien genutzt.

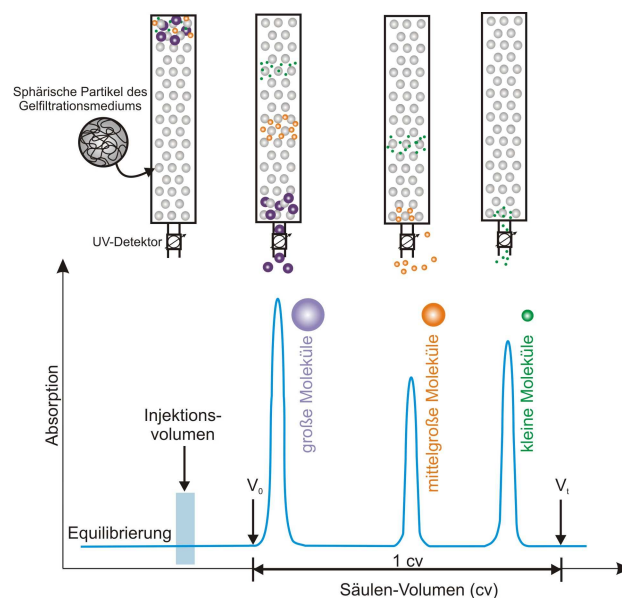
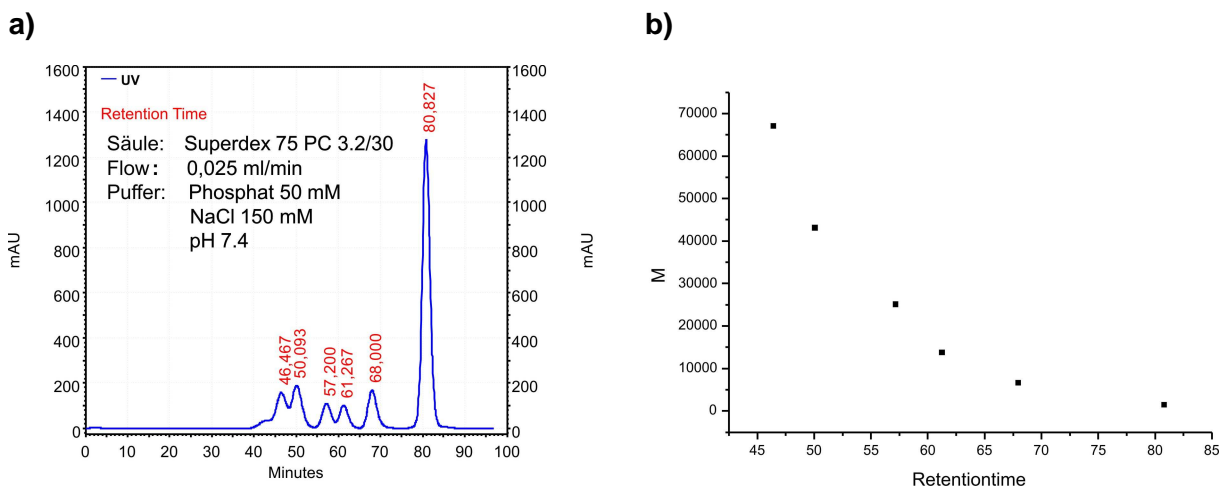


Abbildung 39: Prinzip der Größenausschlusschromatographie.

### 10.3.1 Bestimmung von Molekulargewichten

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes muss die Gelfiltrationssäule zuvor mit geeigneten Substanzen geeicht werden. Da die Trennung der Moleküle nach dem hydrodynamischen Volumen, erfolgt ist, es wichtig, dass als Eichsubstanzen Moleküle ähnlicher Masse und Form gewählt werden. Außerdem muss das Ausschussvolumen  $V_0$  (das

äußere Lösungsmittelvolumen) der Säule ermittelt werden. Hierfür wird üblicherweise Blue Dextran genommen, da dieses Polymer mit seinem Molekulargewicht von ~2000 kDa nicht in die Poren der stationären Phase diffundieren kann. Das Stoffgemisch wird auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen und die Elutionsvolumina  $V_e$  (bzw. Retentionszeiten oder Säulenvolumina  $cV$ ) werden bei konstanter Flussrate des Eluenten mit einem geeigneten Detektionsverfahren (Extinktion, Fluoreszenz, Brechungsindex) aufgenommen (siehe Abbildung 40a). Trägt man nun die Molare Masse der Eichsubstanzen gegen das Elutionsvolumen bzw. die Retentionszeit auf, erkennt man eine nicht lineare Abhängigkeit (siehe Abbildung 40b).



**Abbildung 40:** **a)** Beispiel eines Elutionsprofils eines Stoffgemisches. **b)** Graphische Darstellung der Ergebnisse aus dem in (a) gezeigten Elutionsprofil: Molekulare Masse aufgetragen gegen die Retentionszeit.

Meist wird anstelle des Elutionsvolumens der Verteilungskoeffizient  $K_d$  zur Bestimmung der Molekularmasse genutzt. Dieser gibt die Verteilung der Stoffe zwischen der mobilen und der stationären Phase nach Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes an.

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \text{G- 9}$$

Dabei ist  $V_t$  das Gesamtvolumen der Säule,  $V_g$  ist das Volumen der Gelmatrix und  $V_i$  das innere Volumen.

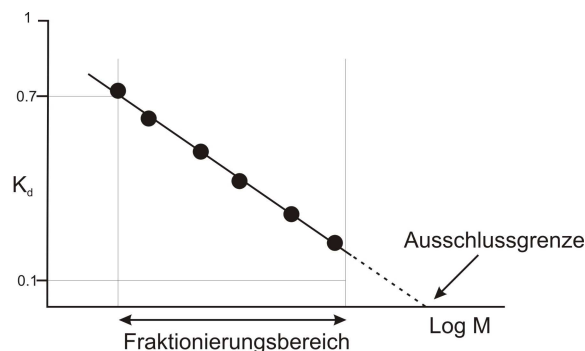
$$V_t = V_0 + V_i + V_g \quad \text{G- 10}$$

Der  $K_d$ -Wert gibt den Anteil des inneren Volumens  $V_i$  an, der für das jeweilige Molekül zugänglich ist. Zwischen dem Verteilungskoeffizienten und der Molaren Masse besteht eine lineare Abhängigkeit (siehe Abbildung 41; G- 11).

$$K_d = -k \cdot \log M + c$$

G- 11

Dabei sind  $k$  und  $c$  Konstanten, die von dem jeweiligen Trenngel abhängig sind.



**Abbildung 41:** Lineare Beziehung zwischen  $K_d$  und  $M$ . Der Verteilungskoeffizient  $K_d$  wird gegen den Logarithmus der Molekularen Masse  $M$  aufgetragen, um eine Eichgerade zur Molekularmassenbestimmung zu erhalten.

### 10.3.2 Versuchsparameter

Die Größenausschlusschromatographie wird in ihrer Trenneffizienz wenig von den einstellbaren Parametern beeinflusst, sondern ist hauptsächlich vom Einsatzbereich des Trenngels abhängig. Die Selektivität wird bestimmt durch:

- ◆ Porengröße des Trenngels
- ◆ Probenvolumen / Säulendimension
- ◆ Ionenkonzentration
- ◆ pH-Wert

Die mobile Phase dient nur als Lösungsmittel und hat keinen unmittelbaren Einfluss auf die Trennleistung. Als wässrige Lösungsmittel kommen Puffer mit mittlerer Ionenstärke (50 bis 150 mM) zum Einsatz. Üblicherweise wird dem Puffer hierfür NaCl zugesetzt. Hierdurch werden ionische Wechselwirkungen zwischen dem Analyt und der stationären Phase



verhindert. Allgemein verbessern ein kleines Probenvolumen und eine niedrige Flussrate die Auflösung.

### 10.3.3 Trenngele

Das Gel besteht aus einer heterogenen Phase, welche üblicherweise Wasser als flüssige sowie eine Matrix mit definierter Porengröße als feste Phase enthält. Die Matrix muss ausreichende chemische und physikalische Stabilität besitzen. Sie besteht aus quervernetzten Polymeren, die ein dreidimensionales Netzwerk aufbauen. Manche Polymere – wie z.B. Agarose – bilden unter geeigneten Bedingungen spontan solche Netzwerke aus. Komponentengele werden hergestellt, indem auf eine bestehende Polymermatrix ein zweites Polymer aufgebracht wird. Ein Beispiel hierfür ist das Superdex™ Gel. Hier sind Dextransketten kovalent an eine stark quervernetzte Agarose-Matrix gebunden. Diese sorgt für eine ausreichend chemische und physikalische Stabilität, wohingegen die Dextransketten für die Trennungseigenschaften des Gels verantwortlich sind.

## 10.4 Analytische Ultrazentrifugation

Bei der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) wird die Sedimentation von Makromolekülen durch die Erzeugung eines Zentrifugalfeldes beschleunigt und die Konzentrationsverteilung von Makromolekülen bzw. Makromolekül-Komplexen in Lösung untersucht.<sup>[236, 237]</sup> Das Haupteinsatzgebiet ist daher nicht die Bestimmung von Molekulargewichten monomerer Moleküle – hierfür gibt es einfachere Methoden wie z.B. die SDS-Gelelektrophorese – sondern die Analyse kurzlebiger Komplexe. Damit wird selbst die Untersuchung von Assoziationsgleichgewichten möglich.

### 10.4.1 Physikalischer Hintergrund

Die gelösten Makromoleküle werden bei der Ultrazentrifugation anhand ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit getrennt, welche vom Gravitationsfeld und der Masse sowie der Form der Makromoleküle abhängt.

Auf ein gelöstes Teilchen mit der effektiven Masse  $m_{eff}$ , das sich mit konstanter Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  auf einer Kreisbahn im Abstand  $r$  um eine Drehachse bewegt, wirkt die Zentrifugalkraft  $F_Z$ :

$$F_Z = m_{\text{eff}} \omega^2 r \quad \text{G- 12}$$

$$m_{\text{eff}} = bm = (1 - \rho_m v_t) m \quad \text{G- 13}$$

Die effektive Masse  $m_{\text{eff}}$  berücksichtigt den Auftrieb  $b$ , den das Teilchen mit seinem spezifischen Volumen  $v_t$  im Lösungsmittel mit der Dichte  $\rho_m$  erfährt. Die Beschleunigung  $B$  des Teilchens nach außen ist sowohl von der Winkelgeschwindigkeit als auch vom Drehachsenabstand abhängig:

$$B = \omega^2 r \quad \text{G- 14}$$

Die Beschleunigung wird üblicherweise auf die Erdbeschleunigung  $g$  ( $981 \text{ cm s}^{-2}$ ) bezogen und als relative Zentrifugalbeschleunigung  $RZB$  angegeben:

$$RZB = \frac{\omega^2 r}{981} \quad \text{G- 15}$$

Bei der Sedimentation der Teilchen in einer viskosen Flüssigkeit wirken ihr die Diffusion (Brown'sche Bewegung) und die Reibung entgegen, sodass sich rasch ein Gleichgewicht mit konstanter Sedimentationsgeschwindigkeit einstellt, welches durch die Svedberg-Gleichung beschrieben wird:

$$v = \frac{d^2(\rho_t - \rho_m)g}{18\eta} \quad \text{G- 16}$$

Dabei ist  $v$  die Sedimentationsgeschwindigkeit,  $d$  der Durchmesser des Moleküls,  $g$  die relative Zentrifugalbeschleunigung,  $\rho_t$  und  $\rho_m$  die Dichte des Teilchens bzw. des Mediums und  $\eta$  die Viskosität des Mediums. Der Sedimentationskoeffizient  $s$  ist die Sedimentationsgeschwindigkeit unter geometrisch vorgegebenen Bedingungen des Zentrifugalfeldes. Seine Dimension ist die Zeit und seine Maßeinheit ist Svedberg ( $1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s}$ ).

$$s = \frac{v}{r\omega^2} \quad \text{G- 17}$$

Die Sedimentationsgeschwindigkeit steigt mit zunehmender Zentrifugalbeschleunigung und sinkt bei zunehmender Viskosität des Lösungsmittels. Für ein ideales sphärisches

Teilchen ist die Sedimentationsgeschwindigkeit proportional zu dessen Größe bzw. Molekulargewicht. Für das Molekulargewicht  $M$  gilt ( $N$ : Loschmidt'sche Zahl):

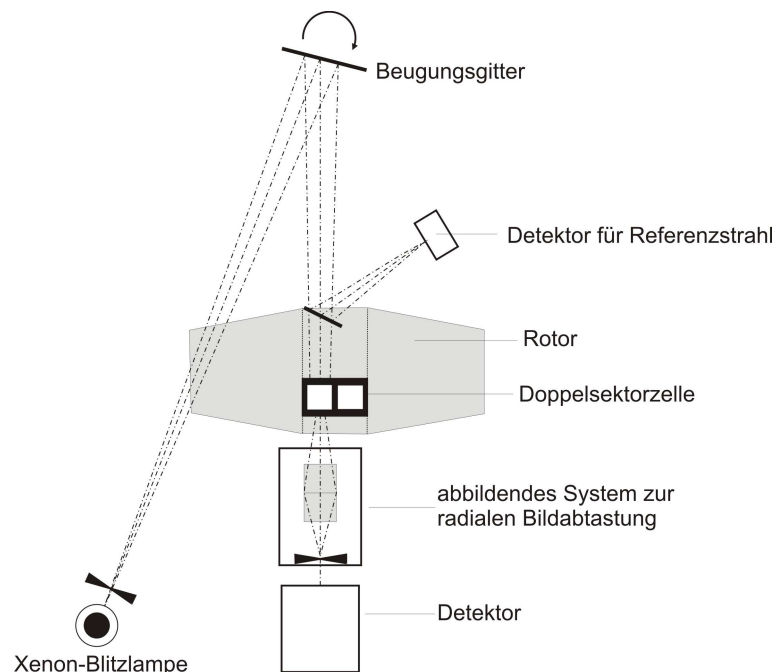
$$M = N\rho_t \frac{1}{6} \pi d^3$$

G- 18

Da die meisten Makromoleküle und Molekülkomplexe aber in der Realität keine Kugelgestalt besitzen, weicht ihr Verhalten mehr oder weniger vom Ideal ab. Sphärische Moleküle sedimentieren schneller als z.B. stabförmige Helices. Die gemessene Sedimentationsgeschwindigkeit ist daher auch eine charakteristische Größe für die Gestalt bzw. den Grad der Denaturierung eines Moleküls.

### 10.4.2 Instrumenteller Aufbau

Moderne Ultrazentrifugen erlauben Drehzahlen von 68.000 U/min, was dem einer 300.000-fachen Erdbeschleunigung entspricht. Aufgrund dieser hohen Drehzahl wird der Rotor der Ultrazentrifugen unter Vakuum betrieben, um Reibung mit Luftmolekülen zu vermeiden, die zum Aufheizen der Zentrifuge führen würde.



**Abbildung 42:** Schematischer Aufbau einer analytischen Ultrazentrifuge; Abbildung nach Lottspeich.<sup>[238]</sup>

Man verwendet sogenannte Doppelsektormesszellen, bei denen eine Referenzzelle mit dem reinen Lösungsmittel und die Probenzelle mit der Probenlösung befüllt wird. Durch einen Spalt werden die Messzellen streifenweise abgetastet und die Intensität des durch Proben- und Referenzsektor gelangten Lichts einzeln gemessen (siehe Abbildung 42). Aus den Messwerten wird die radiale Absorptionsverteilung der gelösten Makromoleküle berechnet, aus der man nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Konzentrationsverteilung erhält:

$$A(r) = -\lg \frac{I(r)}{I_0(r)} = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad \text{G-19}$$

Dabei ist  $A(r)$  die Absorbanz (Extinktion) gemessen im Abstand  $r$ ,  $I$  und  $I_0$  sind die Intensität des transmittierten bzw. einfallenden Lichts,  $\varepsilon_\lambda$  ist der Extinktionskoeffizient,  $c$  die Konzentration der absorbierenden Substanz und  $d$  die Schichtdicke der Messzelle.

Die Temperatur muss während des Experiments schon allein aufgrund der hohen Temperaturabhängigkeit der Viskosität bekannt und stabil sein. Um die Trennwirkung der Ultrazentrifugation zu erhöhen, kann man einen stufenförmigen Dichtegradienten im Medium aufbauen. Hierdurch werden die Unterschiede im Faktor  $(\rho_i - \rho_m)$  besser ausgenutzt.

### 10.4.3 Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment

In diesem Experiment wird die Sedimentationsgeschwindigkeit der Moleküle unter dem Einfluss der Zentrifugalkraft bestimmt. Hierbei wird die Winkelgeschwindigkeit des Rotors so groß gewählt, dass die Makromoleküle am Ende der Messung am Boden der Messzelle sind. Zeitabhängig wird die radiale Absorptionsverteilung gemessen, die nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz proportional zur Konzentration ist.

### 10.4.4 Sedimentationsgleichgewichts-Experimente

Bei diesem Versuch wird die Winkelgeschwindigkeit so klein gewählt, dass sich Sedimentation und Diffusion die Waage halten. Hier geht allein das effektive Molekulargewicht als Strukturparameter in das Konzentrationsprofil ein. Das Sedimentationsgleichgewichts-Experiment ist daher hervorragend dazu geeignet das Molekulargewicht von selbst-assoziiierenden Molekülkomplexen zu bestimmen. So lässt sich ein Einblick über die Verteilung der verschiedenen Oligomere im Gleichgewicht gewinnen. Für ideale Lösungen einheitlicher Makromoleküle erhält man eine Boltzmann-Verteilung.

## **10.5 Transmissionselektronenmikroskopie**

Der französische Wissenschaftler Louis-Victor de Broglie entdeckte die Wellennatur von Elektronen und wurde hierfür 1929 mit dem Nobelpreis für Physik geehrt. Die Auflösungsgrenze der konventionellen Lichtmikroskopie, die durch die Wellenlänge des Lichts bestimmt wird, kann durch die Nutzung von Elektronen als Wellen mit Wellenlängen weit unter einem Nanometer überwunden werden. Anfang der dreißiger Jahre des letzten Jahrhunderts bauten Max Knoll und Ernst Ruska das erste Transmissionselektronenmikroskop (TEM) und 1939 brachte Siemens das erste kommerzielle Instrument auf den Markt.

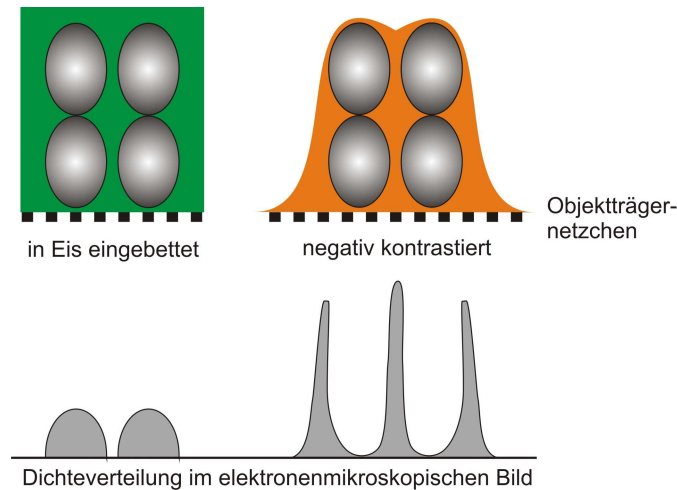
### **10.5.1 Instrumentelle Grundlagen**

Anstelle von Glaslinsen werden bei der Transmissionselektronenmikroskopie die Elektronen durch magnetische Sammellinsen fokussiert. Als Elektronenquelle dient eine Kathode, die durch Aufheizen Elektronen emittiert. Durch das anlegen einer Spannung an eine Anode werden die Elektronen im Vakuum beschleunigt und durchstrahlen die Probe. Hierbei werden einige Elektronen an den gebundenen Elektronen der Atome gestreut und wieder andere durchtreten die Probe ohne Ablenkung, da sie auf die Lücke zwischen den Atomen treffen. Für eine gute Auflösung sollte die Probe möglichst dünn präpariert werden, sodass keine Absorption und keine Vielfachstreuung der Elektronen auftritt. Es sind Vergrößerungen zwischen 100-fach und 800.000-fach einstellbar, wobei bei biologischen Proben wegen ihrer geringen Elektronendichte meist nur eine Auflösung von ein bis zwei Nanometer erreicht wird (ca. 300.000-fache Vergrößerung). Die Abbildung der Probe kann während der Messung direkt auf einem Fluoreszenzschirm betrachtet werden und zur Archivierung auf Negativfilm oder mittels einer empfindlichen Digitalkamera aufgenommen werden. Durch die Serienbildaufnahmen unter verschiedenen Projektionswinkeln ist sogar eine dreidimensionale Rekonstruktion von Objekten möglich.

### **10.5.2 Probenpräparation**

Damit die Probe im Hochvakuum des Elektronenmikroskops nicht durch Trocknungsartefakte zerstört wird, kann diese durch unterschiedlichste präparative Maßnahmen wie z.B. der Einbettung in eine polymere Matrix, der Cryo-Fixierung oder der Kontrastierung geschützt werden. Bei der Untersuchung von Proteinen haben sich die letzten beiden Methoden bewährt. Zuvor wird die Probelösung auf ein mit Kohle bedampftes und ionisiertes

Objektträgernetzchen aus Metall gegeben und das überschüssige Lösungsmittel wird mit einem Filterpapier abgesaugt.



**Abbildung 43:** Cryo-Fixierung (links) und negative staining (rechts); Abbildung nach Lottspeich.<sup>[238]</sup>

Bei der Cryo-Fixierung wird anschließend die noch feuchte Probe in flüssigem Ethan bei  $-135^{\circ}\text{C}$  schockgefroren, sodass die Bildung von Eiskristallen verhindert wird (siehe Abbildung 43 links). Diese Methode minimiert die Artefaktbildung, und ermöglicht durch ihre hohe Auflösung teilweise sogar eine atomare Rekonstruktion. Allerdings bleibt der Kontrast aufgrund der geringen Elektronendichte biologischer Proben sehr gering. Um den schwachen Kontrast zu erhöhen, kann man alternativ auch Schwermetallsalze zur Färbung einsetzen (*negative staining*). Das Kontrastmittel lagert sich an die Proteinmoleküle an und füllt Hohlräume aus. Nach Lufttrocknung wird so die dreidimensionale Struktur durch die Schwermetallhülle über einen Zeitraum von mehreren Wochen bis Monaten konserviert. Die Probe ist zudem strahlungsresistenter und durch die im Kontrastmittel enthaltenen schweren Atome wie Blei oder Uran werden die Elektronen stärker gestreut. Man erhält ein kontrastreiches negatives Abbild der Probe (siehe Abbildung 43 rechts).

## 11 METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG DER PROTEINSTABILITÄT

Die Funktion eines Proteins oder eines Proteinkomplexes ist an eine definierte dreidimensionale aktive Struktur gekoppelt. Eine gewisse Stabilität dieser Proteinstruktur ist daher Grundvoraussetzung für die Funktion eines Proteins. Es ist daher von großem Interesse, Informationen über die Stabilität der aktiven Konformation oder eines Protein-Liganden Komplexes zu gewinnen. Die folgende Tabelle zeigt eine Auswahl von Methoden, mit denen es teilweise möglich ist, detaillierte thermodynamische Informationen zu erhalten. Einige Methoden erlauben zwar nicht die Generierung von thermodynamischen Daten, sind aber ein nützliches Hilfsmittel, um innerhalb einer Serie von Proteinmutanten relative Stabilitäten miteinander zu vergleichen.

**Tabelle 4:** Überblick über verbreitete Methoden zur Bestimmung der Stabilität von Proteinen.

<b>Methode</b>	<b>Beschreibung und Anwendung</b>
<i>Denaturierungs Experimente</i>	Die native Struktur wird Schrittweise durch die Zugabe von denaturierenden Reagenzien (GdnHCl, Harnstoff) oder Temperaturerhöhung destabilisiert. Der Übergang zur ungefalteten Struktur kann mit Hilfe von zahlreichen spektroskopischen Methoden aufgezeichnet werden, indem die strukturell relevanten Signale beobachtet werden (siehe auch Proteolyse).
<i>ITC</i>	<i>isotherme Titrationskalorimetrie (Isothermal Titration Calorimetry)</i> – Ein Bindungspartner wird in der Probezelle vorgelegt und der Interaktionspartner wird schrittweise hinzugegeben. Die Bildung des Komplexes resultiert in einer zusätzlichen Wärmeaufnahme oder Wärmeabgabe der Probe. Aus der Temperaturänderung lassen sich die Bildungskonstante $K$ des Komplexes, die stöchiometrische Zusammensetzung, die Bildungsenthalpie $\Delta H$ , die Änderung der Entropie $\Delta S$ und die Änderung der Wärmekapazität $\Delta C_p$ berechnen.
<i>Moleküldynamik-Computersimulationen</i>	In der Moleküldynamik (MD) werden die Bewegungen der Atome in einem Molekül unter Einbeziehung der hier wirkenden Kräfte mit dem Computer simuliert und so die Stabilitäten von Strukturen abgeschätzt. Siehe Abschnitt 11.2.
<i>Proteolyse</i>	Die unterschiedliche proteolytische Zugänglichkeit von ungefalteten und gefalteten Protein erlaubt eine Quantifizierung der Protein-stabilität. Das Protein wird in Abhängigkeit von der Konzentration eines denaturierenden Agens der Proteolyse unterworfen. Die darauf folgende Elektrophorese ermöglicht die Bestimmung des noch gefalteten Proteinanteils.

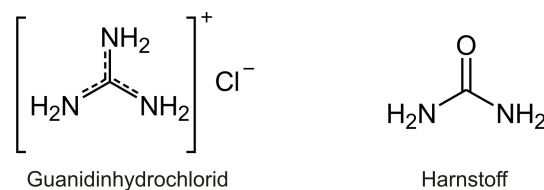
<b>Methode</b>	<b>Beschreibung und Anwendung</b>
<i>SPR</i>	<i>Surface Plasmon Resonance</i> – SPR ist eine labelfreie Methode, die eine Echtzeitanalyse der Assoziation und Dissoziation von Molekülen ermöglicht. Die Methode detektiert den Massenunterschied bei der Interaktion eines immobilisierten Moleküls mit dem mobilen Liganden. SPR liefert sowohl Informationen über die Bindungsstärke als auch die Kinetik der Komplexbildung.

---



## 11.1 Thermodynamische Analyse der Proteinfaltung mittels der CD-Spektroskopie

Eine Standardmethode, um die konformationelle Stabilität von Proteinen zu bestimmen und diese in einer Reihe von mutierten Proteinen zu vergleichen, ist die schrittweise thermisch oder chemisch induzierte Denaturierung. Bei der chemischen Denaturierung sind Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl) oder Harnstoff die gebräuchlichsten Agenzien (siehe Abbildung 44).



**Abbildung 44:** Strukturformeln der denaturierenden Agenzien Guanidiniumhydrochlorid und Harnstoff.

Diese Agenzien können das Gleichgewicht zwischen dem nativen gefalteten ( $N$ ) und dem denaturierten ungefalteten ( $U$ ) Protein beeinflussen.<sup>[239]</sup> Im einfachsten Fall gilt das Zweizustandsmodell:



Die native Konformation eines Proteins entspricht dem Zustand mit der kleinsten Freien Enthalpie  $\Delta G$  (Gibbs Energie). Für die Freie Entfaltungsentnergie  $\Delta G_U$  gilt daher:

$$\Delta G_U = -RT \cdot \ln(K_U) \quad \text{G- 21}$$

Dabei ist  $R$  die allgemeine Gaskonstante,  $T$  die Temperatur in Kelvin und  $K_U$  die Gleichgewichtskonstante der Entfaltung. Die Gleichgewichtskonstante der Entfaltung ist gegeben durch die Konzentrationsanteile des Proteins in der nativen ( $f_N$ ) oder ungefalteten ( $f_U$ ) Konformation:

$$K_U = \frac{f_U}{f_N} = \frac{f_U}{1 - f_U} \quad \text{G- 22}$$

$$\Delta G_U = -RT \cdot \ln\left(\frac{f_U}{1-f_U}\right) \quad \text{G- 23}$$

Die durch denaturierende Agenzien induzierte Verschiebung des Gleichgewichtes vom nativ gefalteten Protein zum ungefalteten Protein ( $U$ ) kann mit Hilfe von zahlreichen spektroskopischen Methoden verfolgt werden. Bei der CD-Spektroskopie wird das CD-Signal (Elliptizität  $[\theta]$ ) in Abhängigkeit von der Konzentration der denaturierenden Agenzien aufgezeichnet. Diese Methode ist besonders für  $\alpha$ -helixreiche Proteine geeignet, da hier das sekundärspezifische Signal bei einer Wellenlänge von 222 nm beobachtet werden kann. Aus dem CD-Signal erhält man mit folgender Gleichung den jeweiligen Anteil des nativen Proteins bei gegebener Konzentration des denaturierenden Agens:

$$f_N = \frac{[\theta] - [\theta]_U}{[\theta]_N - [\theta]_U} \quad \text{G- 24}$$

$$f_U = 1 - f_N \quad \text{G- 25}$$

Dabei ist  $[\theta]$  die gemessene molare Elliptizität und  $[\theta]_N$  und  $[\theta]_U$  sind die molaren Elliptizitäten des Proteins in der nativen bzw. ungefalteten Konformation.  $\Delta G_U$  ist linear von der Konzentration des denaturierenden Agens abhängig.<sup>[240, 241]</sup> Daher ist es mittels einer linearen Extrapolation auch möglich, die Proteinstabilität in Abwesenheit des denaturierenden Agens zu bestimmen. Die Abhängigkeit der Freien Energie von der Konzentration des denaturierenden Agens wird durch den Koeffizienten  $m$  (Steigung der Gerade) ausgedrückt:

$$\Delta G_U = \Delta G_U^{H_2O} - m \cdot [D] \quad \text{G- 26}$$

$$\Delta G_U^{H_2O} = -RT \cdot \ln\left(\frac{f_U}{1-f_U}\right) + m \cdot [D] \quad \text{G- 27}$$

Dabei ist  $\Delta G_U^{H_2O}$  die Freie Entfaltungsennergie in Abwesenheit von denaturierenden Agenzien,  $m$  der Koeffizient und  $[D]$  die Konzentration des denaturierenden Agens. Wenn 50 % des Proteins entfaltet sind, gilt  $f_U = f_N$  und die Gleichung G-27 vereinfacht sich zu:

$$\Delta G_U^{H_2O} = m \cdot [D_{50\%}] \quad \text{G- 28}$$

Um die Freie Energie in einer Serie von verschiedenen Proteinen oder Peptiden miteinander zu vergleichen, berechnet man die  $\Delta\Delta G_U^{H2O}$ -Werte:<sup>[242]</sup>

$$\Delta\Delta G_U^{H2O} = \frac{m_{wt} + m}{2} \cdot ([D_{50\%}] - [D_{50\%,wt}]) \quad \mathbf{G-29}$$

Dabei ist  $\Delta\Delta G_U^{H2O}$  die Differenz in der Freien Energie,  $m_{wt}$  der lineare Koeffizient des Bezugsproteins (*wt*; *wild type*) und  $[D_{50\%,wt}]$  die Konzentration des denaturierenden Agens an dem das Bezugsprotein zu 50 % denaturiert ist.

## 11.2 Moleküldynamik Computersimulationen

Moleküldynamik-Simulation (MD) ist eine Technik der Computer-gestützten Chemie und erlaubt die Beschreibung der Bewegung eines Moleküls.<sup>[243]</sup> Die Newton'schen Gesetze zur Bewegung makroskopischer Körper werden hierfür auf die durch Kraftfeldberechnungen erhaltene potentielle Energie eines Teilchensystems angewendet. Ein Kraftfeld ist eine klassisch-mechanische Beschreibung von bindenden (Bindungslängen, Bindungswinkel, Torsionswinkel) und nicht-bindenden Wechselwirkungen (van-der Waals und elektrostatische Wechselwirkungen) eines molekularen Systems.

Zu Beginn einer Moleküldynamikberechnung wird eine Startstruktur benötigt. Die hierfür benötigten geometrischen Informationen werden meist aus Kristallstrukturdaten eines strukturverwandten Moleküls bezogen. In kurzen Zeitschritten berechnet man alle Kräfte, die auf die Atome in ihrer individuellen Molekülumgebung wirken und erhält aus der daraus resultierenden Bewegung der Atome für diese neue Ortskoordinaten. Eine Sequenz von Momentaufnahmen dieser strukturellen Veränderungen wird als Trajektorie bezeichnet. Als Zeitschritte werden typischerweise zwei Femtosekunden gewählt, da dies der Schwingungsperiode einer typischen kovalenten Bindung entspricht. Die einzelnen Momentaufnahmen können später in einer Animation zusammengefügt werden. Bei der Simulation von biologisch-relevanten Molekülen wie den hier vorgestellten *coiled coil*-Systemen ist der Einfluss des polaren Lösungsmittels Wasser von zentraler Bedeutung. Aus diesem Grund werden Lösungsmittelmodelle verwendet, die explizite Wassermoleküle simulieren.

Bei der MD-Berechnung ist nicht nur das Molekül an sich, sondern auch das Lösungsmittel zu berücksichtigen. Das Simulationssystem muss solvatisiert werden, da im Vakuum eine Verzerrung der Kräfte stattfinden würde.

## 12 LITERATUR

- [1] G. L. Butterfoss, B. Kuhlman, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2006**, *35*, 49.
- [2] J. Reina, E. Lacroix, S. D. Hobson, G. Fernandez-Ballester, V. Rybin, M. S. Schwab, L. Serrano, C. Gonzalez, *Nat Struct Biol* **2002**, *9*, 621.
- [3] L. L. Looger, M. A. Dwyer, J. J. Smith, H. W. Hellinga, *Nature* **2003**, *423*, 185.
- [4] S. M. Malakauskas, S. L. Mayo, *Nat Struct Biol* **1998**, *5*, 470.
- [5] R. E. Dutch, T. S. Jardetzky, R. A. Lamb, *Biosci Rep* **2000**, *20*, 597.
- [6] D. M. Eckert, P. S. Kim, *Annu Rev Biochem* **2001**, *70*, 777.
- [7] K. P. Hopfner, A. Karcher, D. S. Shin, L. Craig, L. M. Arthur, J. P. Carney, J. A. Tainer, *Cell* **2000**, *101*, 789.
- [8] K. P. Hopfner, A. Karcher, L. Craig, T. T. Woo, J. P. Carney, J. A. Tainer, *Cell* **2001**, *105*, 473.
- [9] K. Pagel, B. Kokschi, *Curr Opin Chem Biol* **2008**, *12*, 730.
- [10] C. N. Pace, *Nat Struct Mol Biol* **2009**, *16*, 681.
- [11] G. D. Rose, R. Wolfenden, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **1993**, *22*, 381.
- [12] D. W. Bolen, G. D. Rose, *Annu Rev Biochem* **2008**, *77*, 339.
- [13] A. E. Mirsky, L. Pauling, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1936**, *22*, 439.
- [14] D. F. Stickle, L. G. Presta, K. A. Dill, G. D. Rose, *J Mol Biol* **1992**, *226*, 1143.
- [15] J. Gao, J. W. Kelly, *Protein Science* **2008**, *17*, 1096.
- [16] J. K. Myers, C. N. Pace, *Biophys J* **1996**, *71*, 2033.
- [17] J. Gao, D. A. Bosco, E. T. Powers, J. W. Kelly, *Nat Struct Mol Biol* **2009**, *16*, 684.
- [18] W. Kauzmann, *Adv Protein Chem* **1959**, *14*, 1.
- [19] F. M. Richards, *Annu Rev Biophys Bioeng* **1977**, *6*, 151.
- [20] B. Lee, *Protein Sci* **1993**, *2*, 733.
- [21] J. M. Ahn, N. A. Boyle, M. T. MacDonald, K. D. Janda, *Mini Rev Med Chem* **2002**, *2*, 463.
- [22] M. R. Arkin, J. A. Wells, *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3*, 301.
- [23] W. S. Horne, S. H. Gellman, *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 1399.
- [24] M. M. Schemjakin, *Angewandte Chemie* **1960**, *72*, 342.
- [25] Y. Hamada, T. Shioiri, *Chem Rev* **2005**, *105*, 4441.
- [26] F. Sarabia, S. Chammaa, A. S. Ruiz, L. M. Ortiz, F. J. Herrera, *Curr Med Chem* **2004**, *11*, 1309.
- [27] E. Hamel, D. G. Covell, *Curr Med Chem Anticancer Agents* **2002**, *2*, 19.
- [28] J. A. Scheike, C. Baldauf, J. Spengler, F. Albericio, M. T. Pisabarro, B. Kokschi, *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, *46*, 7766.
- [29] J. W. Blankenship, R. Balambika, P. E. Dawson, *Biochemistry* **2002**, *41*, 15676.
- [30] S. Deechongkit, P. E. Dawson, J. W. Kelly, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 16762.
- [31] S. Deechongkit, H. Nguyen, E. T. Powers, P. E. Dawson, M. Gruebele, J. W. Kelly, *Nature* **2004**, *430*, 101.

- [32] J. Spengler, B. Koksich, F. Albericio, *Biopolymers* **2007**, 88, 823.
- [33] O. Kuisle, E. Quinoa, R. Riguera, *J Org Chem* **1999**, 64, 8063.
- [34] S. Deechongkit, S. L. You, J. W. Kelly, *Org Lett* **2004**, 6, 497.
- [35] Y. Fu, J. Gao, J. Bieschke, M. A. Dendle, J. W. Kelly, *J Am Chem Soc* **2006**, 128, 15948.
- [36] E. Wolf, P. S. Kim, B. Berger, *Protein Sci* **1997**, 6, 1179.
- [37] C. Cohen, D. A. Parry, *Science* **1994**, 263, 488.
- [38] R. S. Hodges, *Biochem Cell Biol* **1996**, 74, 133.
- [39] A. Lupas, *Trends Biochem Sci* **1996**, 21, 375.
- [40] W. D. Kohn, C. T. Mant, R. S. Hodges, *J Biol Chem* **1997**, 272, 2583.
- [41] R. Siegert, M. R. Leroux, C. Scheufler, F. U. Hartl, I. Moarefi, *Cell* **2000**, 103, 621.
- [42] F. Crick, *Acta Crystallographica* **1953**, 6, 689.
- [43] P. Burkhard, M. Meier, A. Lustig, *Protein Sci* **2000**, 9, 2294.
- [44] R. S. Hodges, A. K. Saund, P. C. Chong, S. A. St-Pierre, R. E. Reid, *J Biol Chem* **1981**, 256, 1214.
- [45] Y. B. Yu, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, 1113.
- [46] E. K. O'Shea, J. D. Klemm, P. S. Kim, T. Alber, *Science* **1991**, 254, 539.
- [47] J. Liu, Q. Zheng, Y. Deng, C. S. Cheng, N. R. Kallenbach, M. Lu, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, 15457.
- [48] S. Y. Lau, A. K. Taneja, R. S. Hodges, *J Biol Chem* **1984**, 259, 13253.
- [49] J. F. Conway, D. A. Parry, *Int J Biol Macromol* **1990**, 12, 328.
- [50] J. F. Conway, D. A. Parry, *Int J Biol Macromol* **1991**, 13, 14.
- [51] L. Gonzalez, Jr., D. N. Woolfson, T. Alber, *Nat Struct Biol* **1996**, 3, 1011.
- [52] S. A. Potekhin, V. N. Medvedkin, I. A. Kashparov, S. Venyaminov, *Protein Eng* **1994**, 7, 1097.
- [53] D. L. McClain, H. L. Woods, M. G. Oakley, *J Am Chem Soc* **2001**, 123, 3151.
- [54] E. K. O'Shea, K. J. Lumb, P. S. Kim, *Curr Biol* **1993**, 3, 658.
- [55] T. J. Graddis, D. G. Myszka, I. M. Chaiken, *Biochemistry* **1993**, 32, 12664.
- [56] W. D. Kohn, C. M. Kay, R. S. Hodges, *Protein Sci* **1995**, 4, 237.
- [57] P. Burkhard, S. Ivaninskii, A. Lustig, *J Mol Biol* **2002**, 318, 901.
- [58] H. B. Jerry, C. Carolyn, A. D. P. David, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **1996**, 26, 134.
- [59] G. Offer, M. R. Hicks, D. N. Woolfson, *Journal of Structural Biology* **2002**, 137, 41.
- [60] V. Wittmann, in *Glycoscience*, 2nd ed. (Ed.: B. Fraser-Reid, Tatsuta, K., Thiem, J.), Springer-Verlag, Heidelberg, **2008**, pp. 1735.
- [61] J. E. Hewitt, *Biochim Biophys Acta* **2009**, 1792, 853.
- [62] F. Muntoni, M. Brockington, C. Godfrey, M. Ackroyd, S. Robb, A. Manzur, M. Kinali, E. Mercuri, M. Kaluarachchi, L. Feng, C. Jimenez-Mallebrera, E. Clement, S. Torelli, C. A. Sewry, S. C. Brown, *Acta Myol* **2007**, 26, 129.
- [63] F. Sciandra, K. I. Gawlik, A. Brancaccio, M. Durbeej, *Trends Biotechnol* **2007**, 25, 262.

- [64] J. N. Arnold, R. A. Dwek, P. M. Rudd, R. B. Sim, *Immunol Lett* **2006**, *106*, 103.
- [65] I. Brockhausen, *EMBO Rep* **2006**, *7*, 599.
- [66] I. Brockhausen, *Adv Exp Med Biol* **2003**, *535*, 163.
- [67] R. J. Copeland, J. W. Bullen, G. W. Hart, *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2008**, *295*, E17.
- [68] C. Butkinaree, K. Park, G. W. Hart, *Biochim Biophys Acta*, *1800*, 96.
- [69] F. I. Comer, G. W. Hart, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 29179.
- [70] P. M. Fischer, *Nat Chem Biol* **2008**, *4*, 448.
- [71] S. A. Yuzwa, M. S. Macauley, J. E. Heinonen, X. Shan, R. J. Dennis, Y. He, G. E. Whitworth, K. A. Stubbs, E. J. McEachern, G. J. Davies, D. J. Vocadlo, *Nat Chem Biol* **2008**, *4*, 483.
- [72] E. C. Brinkman-Van der Linden, A. Varki, *J Biol Chem* **2000**, *275*, 8625.
- [73] L. Borsig, R. Wong, J. Feramisco, D. R. Nadeau, N. M. Varki, A. Varki, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 3352.
- [74] B. Agrawal, M. J. Krantz, M. A. Reddish, B. M. Longenecker, *Nat Med* **1998**, *4*, 43.
- [75] M. Sapp, M. Bienkowska-Haba, *Febs J* **2009**, *276*, 7206.
- [76] J. Akhtar, D. Shukla, *Febs J* **2009**, *276*, 7228.
- [77] F. T. Liu, G. A. Rabinovich, *Ann N Y Acad Sci* **2010**, *1183*, 158.
- [78] O. Gornik, G. Lauc, *Dis Markers* **2008**, *25*, 267.
- [79] V. Wittmann, in *Glycoscience*, 2nd ed. (Ed.: B. Fraser-Reid, Tatsuta, K., Thiem, J.), Springer-Verlag, Heidelberg, **2008**, pp. 1771.
- [80] R. A. Dwek, *Chem Rev* **1996**, *96*, 683.
- [81] M. R. Wormald, E. W. Wooten, R. Bazzo, C. J. Edge, A. Feinstein, T. W. Rademacher, R. A. Dwek, *Eur J Biochem* **1991**, *198*, 131.
- [82] K. E. Coyne, S. E. Hall, S. Thompson, M. A. Arce, T. Kinoshita, T. Fujita, D. J. Anstee, W. Rosse, D. M. Lublin, *J Immunol* **1992**, *149*, 2906.
- [83] R. G. Spiro, *Glycobiology* **2002**, *12*, 43R.
- [84] J. Hofsteenge, D. R. Muller, T. de Beer, A. Loffler, W. J. Richter, J. F. Vliegthart, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13524.
- [85] P. G. Hultin, *Curr Top Med Chem* **2005**, *5*, 1299.
- [86] P. A. Haynes, *Glycobiology* **1998**, *8*, 1.
- [87] S. J. Cho, G. Roman, F. Yeboah, Y. Konishi, *Curr Med Chem* **2007**, *14*, 1653.
- [88] M. G. Paulick, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **2008**, *47*, 6991.
- [89] D. P. Gamblin, E. M. Scanlan, B. G. Davis, *Chem Rev* **2009**, *109*, 131.
- [90] C. Haase, O. Seitz, in *Glycopeptides and Glycoproteins*, **2007**, pp. 1.
- [91] B. G. Davis, *Chem Rev* **2002**, *102*, 579.
- [92] R. J. Payne, C. H. Wong, *Chem Commun (Camb)* **2010**, *46*, 21.
- [93] R. S. Clark, S. Banerjee, J. K. Coward, *The Journal of Organic Chemistry* **1990**, *55*, 6275.
- [94] Y. He, R. J. Hinklin, J. Chang, L. L. Kiessling, *Org Lett* **2004**, *6*, 4479.
- [95] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244–1251.

- [96] L. A. Salvador, M. Elofsson, J. Kihlberg, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5643.
- [97] R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2149.
- [98] K.-H. Altmann, M. Mutter, *Chemie in unserer Zeit* **1993**, *27*, 274.
- [99] S. B. Kent, *Annu Rev Biochem* **1988**, *57*, 957.
- [100] N. Yamamoto, Y. Ohmori, T. Sakakibara, K. Sasaki, L. R. Juneja, Y. Kajihara, *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, *42*, 2537.
- [101] Z. G. Wang, X. Zhang, M. Visser, D. Live, A. Zatorski, U. Iserloh, K. O. Lloyd, S. J. Danishefsky, *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40*, 1728.
- [102] X. Geng, V. Y. Dudkin, M. Mandal, S. J. Danishefsky, *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 2562.
- [103] C. S. Bennett, C. H. Wong, *Chem Soc Rev* **2007**, *36*, 1227.
- [104] A. Leppanen, S. P. White, J. Helin, R. P. McEver, R. D. Cummings, *J Biol Chem* **2000**, *275*, 39569.
- [105] K. M. Koeller, M. E. Smith, C. H. Wong, *Bioorg Med Chem* **2000**, *8*, 1017.
- [106] S. K. George, T. Schwientek, B. Holm, C. A. Reis, H. Clausen, J. Kihlberg, *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 11117.
- [107] M. Izumi, G. J. Shen, S. Wacowich-Sgarbi, T. Nakatani, O. Plettenburg, C. H. Wong, *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 10909.
- [108] R. Gutierrez Gallego, G. Dudziak, U. Kragl, C. Wandrey, J. P. Kamerling, J. F. Vliegenthart, *Biochimie* **2003**, *85*, 275.
- [109] L. X. Wang, H. Song, S. Liu, H. Lu, S. Jiang, J. Ni, H. Li, *Chembiochem* **2005**, *6*, 1068.
- [110] H. Li, S. Singh, Y. Zeng, H. Song, L. X. Wang, *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 895.
- [111] S. Singh, J. Ni, L. X. Wang, *Bioorg Med Chem Lett* **2003**, *13*, 327.
- [112] C. P. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47*, 10030.
- [113] A. Dirksen, P. E. Dawson, *Curr Opin Chem Biol* **2008**, *12*, 760.
- [114] C. H. Wong, *Science* **1989**, *244*, 1145.
- [115] V. Cerovsky, F. Bordusa, *J Pept Res* **2000**, *55*, 325.
- [116] K. Witte, O. Seitz, C.-H. Wong, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 1979.
- [117] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776.
- [118] Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. H. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 11684.
- [119] B. Wu, J. Chen, J. D. Warren, G. Chen, Z. Hua, S. J. Danishefsky, *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 4116.
- [120] R. Okamoto, S. Souma, Y. Kajihara, *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74*, 2494.
- [121] J. Chen, Q. Wan, Y. Yuan, J. Zhu, S. J. Danishefsky, *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47*, 8521.
- [122] C. Haase, O. Seitz, *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47*, 1553.
- [123] C. Haase, H. Rohde, O. Seitz, *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47*, 6807.
- [124] D. Macmillan, D. W. Anderson, *Org Lett* **2004**, *6*, 4659.



- [125] A. Brik, C. H. Wong, *Chemistry - A European Journal* **2007**, *13*, 5670.
- [126] A. Brik, Y. Y. Yang, S. Ficht, C. H. Wong, *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 5626.
- [127] Y.-Y. Yang, S. Ficht, A. Brik, C.-H. Wong, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 7690.
- [128] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 6705.
- [129] T. J. Tolbert, D. Franke, C. H. Wong, *Bioorg Med Chem* **2005**, *13*, 909.
- [130] C. P. Hackenberger, C. T. Friel, S. E. Radford, B. Imperiali, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 12882.
- [131] D. Macmillan, C. R. Bertozzi, *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 1355.
- [132] L. Wang, P. G. Schultz, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 34.
- [133] Z. Zhang, J. Gildersleeve, Y. Y. Yang, R. Xu, J. A. Loo, S. Uryu, C. H. Wong, P. G. Schultz, *Science* **2004**, *303*, 371.
- [134] R. Xu, S. R. Hanson, Z. Zhang, Y. Y. Yang, P. G. Schultz, C. H. Wong, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 15654.
- [135] Z. Zhang, J. Gildersleeve, Y.-Y. Yang, R. Xu, J. A. Loo, S. Uryu, C.-H. Wong, P. G. Schultz, *Science* **2009**, *326*, 1187.
- [136] R. Xu, S. R. Hanson, Z. Zhang, Y.-Y. Yang, P. G. Schultz, C.-H. Wong, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 13883.
- [137] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 2754.
- [138] B. J. Graves, R. L. Crowther, C. Chandran, J. M. Rumberger, S. Li, K. S. Huang, D. H. Presky, P. C. Familletti, B. A. Wolitzky, D. K. Burns, *Nature* **1994**, *367*, 532.
- [139] W. I. Weis, K. Drickamer, W. A. Hendrickson, *Nature* **1992**, *360*, 127.
- [140] C. A. Hunter, H. L. Anderson, *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, *48*, 7488.
- [141] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem Rev* **2002**, *102*, 555.
- [142] R. S. Kane, *Langmuir* **2010**, *26*, 8636.
- [143] V. M. Krishnamurthy, L. A. Estroff, G. M. Whitesides, *Multivalency in ligand design*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, **2006**.
- [144] R. T. Lee, Y. C. Lee, *Methods Enzymol* **2003**, *362*, 38.
- [145] J. J. Hangeland, J. E. Flesher, S. F. Deamond, Y. C. Lee, O. P. Ts, J. J. Frost, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **1997**, *7*, 141.
- [146] J. P. Tam, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, *85*, 5409.
- [147] G. Thumshirn, U. Hersel, S. L. Goodman, H. Kessler, *Chemistry* **2003**, *9*, 2717.
- [148] P. Niederhafner, J. Šebestík, J. Ježek, *Journal of Peptide Science* **2008**, *14*, 2.
- [149] P. Niederhafner, J. Šebestík, J. Ježek, *Journal of Peptide Science* **2008**, *14*, 44.
- [150] P. Niederhafner, M. Reiniš, J. Šebestík, J. Ježek, *Journal of Peptide Science* **2008**, *14*, 556.
- [151] H. Kamitakahara, T. Suzuki, N. Nishigori, Y. Suzuki, O. Kanie, C.-H. Wong, *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 1524.
- [152] K. Totani, T. Kubota, T. Kuroda, T. Murata, K. I. Hidari, T. Suzuki, Y. Suzuki, K. Kobayashi, H. Ashida, K. Yamamoto, T. Usui, *Glycobiology* **2003**, *13*, 315.

- [153] B. D. Polizzotti, K. L. Kiick, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 483.
- [154] X. Zeng, Y. Nakaaki, T. Murata, T. Usui, *Arch Biochem Biophys* **2000**, *383*, 28.
- [155] X. Zeng, T. Murata, H. Kawagishi, T. Usui, K. Kobayashi, *Carbohydr Res* **1998**, *312*, 209.
- [156] X. Zeng, T. Murata, H. Kawagishi, T. Usui, K. Kobayashi, *Biosci Biotechnol Biochem* **1998**, *62*, 1171.
- [157] C. Unverzagt, S. Kelm, J. C. Paulson, *Carbohydr Res* **1994**, *251*, 285.
- [158] N. E. Davis, L. S. Karfeld-Sulzer, S. Ding, A. E. Barron, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1125.
- [159] L. S. Karfeld, S. R. Bull, N. E. Davis, T. J. Meade, A. E. Barron, *Bioconjug Chem* **2007**, *18*, 1697.
- [160] B. D. Polizzotti, R. Maheshwari, J. Vinkenburg, K. L. Kiick, *Macromolecules* **2007**, *40*, 7103.
- [161] S. Liu, K. L. Kiick, *Macromolecules* **2008**, *41*, 764.
- [162] A. M. Cuesta, D. Sanchez-Martin, L. Sanz, J. Bonet, M. Compte, L. Kremer, F. J. Blanco, B. Oliva, L. Alvarez-Vallina, *PLoS One* **2009**, *4*, e5381.
- [163] V. J. Sanchez-Arevalo Lobo, A. M. Cuesta, L. Sanz, M. Compte, P. Garcia, J. Prieto, F. J. Blanco, L. Alvarez-Vallina, *Int J Cancer* **2006**, *119*, 455.
- [164] C. Y. Fan, C. C. Huang, W. C. Chiu, C. C. Lai, G. G. Liou, H. C. Li, M. Y. Chou, *Faseb J* **2008**, *22*, 3795.
- [165] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. Khazanovich, *Nature* **1993**, *366*, 324.
- [166] J. D. Hartgerink, J. R. Granja, R. A. Milligan, M. R. Ghadiri, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 43.
- [167] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, *Nature* **1994**, *369*, 301.
- [168] L. Motiei, S. Rahimipour, D. A. Thayer, C. H. Wong, M. R. Ghadiri, *Chem Commun (Camb)* **2009**, 3693.
- [169] M. Mutter, R. Hersperger, K. Gubernator, K. Muller, *Proteins* **1989**, *5*, 13.
- [170] P. Dumy, I. M. Eggleston, S. Cervigni, U. Sila, X. Sun, M. Mutter, *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 1255.
- [171] D. Grell, J. S. Richardson, M. Mutter, *J Pept Sci* **2001**, *7*, 146.
- [172] H. K. Rau, N. DeJonge, W. Haehnel, *Angew Chem Int Ed Engl* **2000**, *39*, 250.
- [173] R. Schnepf, P. Horth, E. Bill, K. Wieghardt, P. Hildebrandt, W. Haehnel, *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 2186.
- [174] J. Hauert, J. Fernandez-Carneado, O. Michielin, S. Mathieu, D. Grell, M. Schapira, O. Spertini, M. Mutter, G. Tuchscherer, T. Kovacsovics, *Chembiochem* **2004**, *5*, 856.
- [175] G. T. Dolphin, P. Dumy, J. Garcia, *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 2699.
- [176] O. Renaudet, P. Dumy, *Org Lett* **2003**, *5*, 243.
- [177] O. Renaudet, K. Krenek, I. Bossu, P. Dumy, A. Kadek, D. Adamek, O. Vanek, D. Kavan, R. Gazak, M. Sulc, K. Bezouska, V. Kren, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 6800.
- [178] D. Boturyn, J. L. Coll, E. Garanger, M. C. Favrot, P. Dumy, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 5730.

- [179] N. Chopra, W. Gan, H. Schreiber, J. W. Kurutz, S. C. Meredith, *Bioconjug Chem* **2009**, *20*, 231.
- [180] M. J. Pandya, G. M. Spooner, M. Sunde, J. R. Thorpe, A. Rodger, D. N. Woolfson, *Biochemistry* **2000**, *39*, 8728.
- [181] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97.
- [182] J. Kihlberg, M. Elofsson, L. A. Salvador, *Methods Enzymol* **1997**, *289*, 221.
- [183] J. A. Falenski, U. I. M. Gerling, B. Kokschi, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 3703.
- [184] M. Broncel, J. A. Falenski, S. C. Wagner, C. P. Hackenberger, B. Kokschi, *Chemistry* **2010**, *16*, 7881.
- [185] M. G. Ryadnov, A. Bella, S. Timson, D. N. Woolfson, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 13240.
- [186] J. A. Scheike, diploma thesis, Freie Universität Berlin (Berlin), **2005**.
- [187] C. Gribbon, K. J. Channon, W. Zhang, E. F. Banwell, E. H. Bromley, J. B. Chaudhuri, R. O. Oreffo, D. N. Woolfson, *Biochemistry* **2008**, *47*, 10365.
- [188] H. Dong, S. E. Paramonov, J. D. Hartgerink, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 13691.
- [189] H. Zhu, S. A. Celinski, J. M. Scholtz, J. C. Hu, *Protein Sci* **2001**, *10*, 24.
- [190] S. J. Ryan, A. J. Kennan, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 10255.
- [191] A. Wimo, B. Winblad, L. Jönsson, *Alzheimer's and Dementia* **2010**, *6*, 98.
- [192] T. Takahashi, H. Mihara, *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 1309.
- [193] M. Citron, *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9*, 387.
- [194] D. Schenk, R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandever, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games, P. Seubert, *Nature* **1999**, *400*, 173.
- [195] R. Dodel, H. Hampel, C. Depboylu, S. Lin, F. Gao, S. Schock, S. Jackel, X. Wei, K. Buerger, C. Hoft, B. Hemmer, H. J. Moller, M. Farlow, W. H. Oertel, N. Sommer, Y. Du, *Ann Neurol* **2002**, *52*, 253.
- [196] D. Morgan, D. M. Diamond, P. E. Gottschall, K. E. Ugen, C. Dickey, J. Hardy, K. Duff, P. Jantzen, G. DiCarlo, D. Wilcock, K. Connor, J. Hatcher, C. Hope, M. Gordon, G. W. Arendash, *Nature* **2000**, *408*, 982.
- [197] M. Sunde, L. C. Serpell, M. Bartlam, P. E. Fraser, M. B. Pepys, C. C. Blake, *J Mol Biol* **1997**, *273*, 729.
- [198] R. Nelson, D. Eisenberg, *Curr Opin Struct Biol* **2006**, *16*, 260.
- [199] O. S. Makin, L. C. Serpell, *Febs J* **2005**, *272*, 5950.
- [200] C. M. Dobson, *Nature* **2002**, *418*, 729.
- [201] R. Nelson, M. R. Sawaya, M. Balbirnie, A. O. Madsen, C. Riek, R. Grothe, D. Eisenberg, *Nature* **2005**, *435*, 773.
- [202] C. Wurth, N. K. Guimard, M. H. Hecht, *J Mol Biol* **2002**, *319*, 1279.
- [203] M. Lopez de la Paz, L. Serrano, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 87.
- [204] C. J. Roberts, *Biotechnol Bioeng* **2007**, *98*, 927.
- [205] J. T. Jarrett, P. T. Lansbury, *Cell* **1993**, *73*, 1055.

- [206] M. T. Pastor, A. Esteras-Chopo, M. Lopez de la Paz, *Curr Opin Struct Biol* **2005**, *15*, 57.
- [207] B. Ciani, E. G. Hutchinson, R. B. Sessions, D. N. Woolfson, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 10150.
- [208] K. Pagel, S. C. Wagner, K. Samedov, H. von Berlepsch, C. Böttcher, B. Kokschi, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 2196.
- [209] K. Pagel, S. C. Wagner, R. Rezaei Araghi, H. von Berlepsch, C. Böttcher, B. Kokschi, *Chemistry* **2008**, *14*, 11442.
- [210] K. Pagel, T. Seri, H. von Berlepsch, J. Griebel, R. Kirmse, C. Böttcher, B. Kokschi, *Chembiochem* **2008**, *9*, 531.
- [211] L. Tjernberg, W. Hosia, N. Bark, J. Thyberg, J. Johansson, *J Biol Chem* **2002**, *277*, 43243.
- [212] R. A. Kammerer, D. Kostrewa, J. Zurdo, A. Detken, C. Garcia-Echeverria, J. D. Green, S. A. Muller, B. H. Meier, F. K. Winkler, C. M. Dobson, M. O. Steinmetz, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 4435.
- [213] J. P. Schneider, D. J. Pochan, B. Ozbas, K. Rajagopal, L. Pakstis, J. Kretsinger, *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 15030.
- [214] S. C. Wagner, M. Roskamp, M. Pallerla, R. R. Araghi, S. Schlecht, B. Kokschi, *Small* **2010**, *6*, 1321.
- [215] T. Vagt, O. Zschornig, D. Huster, B. Kokschi, *Chemphyschem* **2006**, *7*, 1361.
- [216] K. Rajagopal, J. P. Schneider, *Curr Opin Struct Biol* **2004**, *14*, 480.
- [217] A. Aggeli, M. Bell, L. M. Carrick, C. W. Fishwick, R. Harding, P. J. Mawer, S. E. Radford, A. E. Strong, N. Boden, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 9619.
- [218] M. R. Caplan, E. M. Schwartzfarb, S. Zhang, R. D. Kamm, D. A. Lauffenburger, *J Biomater Sci Polym Ed* **2002**, *13*, 225.
- [219] D. J. Pochan, J. P. Schneider, J. Kretsinger, B. Ozbas, K. Rajagopal, L. Haines, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 11802.
- [220] J. Kisiday, M. Jin, B. Kurz, H. Hung, C. Semino, S. Zhang, A. J. Grodzinsky, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 9996.
- [221] M. Reches, E. Gazit, *Science* **2003**, *300*, 625.
- [222] J. D. Knight, J. A. Hebda, A. D. Miranker, *Biochemistry* **2006**, *45*, 9496.
- [223] J. A. Williamson, J. P. Loria, A. D. Miranker, *J Mol Biol* **2009**, *393*, 383.
- [224] N. E. Zhou, C. M. Kay, R. S. Hodges, *J Mol Biol* **1994**, *237*, 500.
- [225] Y. H. Chen, J. T. Yang, K. H. Chau, *Biochemistry* **1974**, *13*, 3350.
- [226] G. T. Westermark, K. H. Johnson, P. Westermark, *Methods Enzymol* **1999**, *309*, 3.
- [227] Q. Li, J. S. Lee, C. Ha, C. B. Park, G. Yang, W. B. Gan, Y. T. Chang, *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 6331.
- [228] E. E. Nesterov, J. Skoch, B. T. Hyman, W. E. Klunk, B. J. Bacskai, T. M. Swager, *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, *44*, 5452.
- [229] P. Inbar, J. Yang, *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16*, 1076.
- [230] M. R. Krebs, E. H. Bromley, A. M. Donald, *J Struct Biol* **2005**, *149*, 30.
- [231] M. Groenning, L. Olsen, M. van de Weert, J. M. Flink, S. Frokjaer, F. S. Jørgensen, *Journal of Structural Biology* **2007**, *158*, 358.

- [232] M. Harel, L. K. Sonoda, I. Silman, J. L. Sussman, T. L. Rosenberry, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 7856.
- [233] C. Retna Raj, R. Ramaraj, *Chemical Physics Letters* **1997**, *273*, 285.
- [234] M. Ilanchelian, R. Ramaraj, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2004**, *162*, 129.
- [235] L. Qin, J. Vastl, J. Gao, *Molecular BioSystems* **2010**, *6*, 1791.
- [236] T. Svedberg, *Endeavour* **1947**, *6*, 89.
- [237] T. M. Laue, W. F. Stafford, 3rd, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **1999**, *28*, 75.
- [238] F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, **1998**.
- [239] A. Moglich, F. Krieger, T. Kiefhaber, *J Mol Biol* **2005**, *345*, 153.
- [240] C. N. Pace, *Methods Enzymol* **1986**, *131*, 266.
- [241] J. K. Myers, C. N. Pace, J. M. Scholtz, *Protein Sci* **1995**, *4*, 2138.
- [242] D. Sali, M. Bycroft, A. R. Fersht, *Journal of Molecular Biology* **1991**, *220*, 779.
- [243] W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *Angewandte Chemie* **1990**, *102*, 1020.