

3 Einleitung

3.1 Proteinstrukturen

Proteine bilden eine molekulare Architektur aus, die auf globulären und kompakten Substrukturen (Domänen) beruht. Diese, auch als Atome eines Proteins bezeichnet [2], sind autonom faltende Einheiten und tragen oft eine biologische Funktion. Sie definieren sich auf einer Ebene zwischen Sekundärstrukturelementen und dem gesamten Protein. Domänen bestehen aus einem kompakten, strukturellen Kern (Motiv), der allen Mitgliedern der Domänenfamilie (Superfamilie) gemein ist. Die einzelnen Domänen besitzen nur wenige zusätzliche Sekundärstrukturelemente, die aus diesem Kern herausfallen [3]. Sekundärstrukturelemente entstehen durch Faltung (räumliche Anordnung) aus der Primärstruktur (AS-Sequenz des Proteins) und treten in drei Formen auf: α -Helix, β -Turn und β -Faltblatt.

Die α -Helix als Sekundärstrukturelement ist überwiegend rechtsgängig gewunden und stabilisiert sich über intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen, die jede $(i+4)$ -te AS miteinander verbinden. Die Seitenketten zeigen dabei nach außen. Der β -Turn (Schleife) kehrt die Laufrichtung der Peptidkette um. Die Stabilisierung erfolgt z.B. über eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen AS_i und AS_{i+3} . Es gibt verschiedene Typen von Schleifen, abhängig von der Anzahl der involvierten AS, der Position der stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen und der Diederwinkel [4, 5]. β -Faltblätter stabilisieren sich vorwiegend über Wasserstoffbrückenbindungen des Rückgrates zwischen benachbarten Peptidsträngen. Dies kann in paralleler und antiparalleler Ausrichtung geschehen. Die Peptidebene ähnelt einem gefalteten Blatt und die Seitenketten weisen aus der Ebene heraus. Im Gegensatz zur α -Helix ist die Struktur in β -Faltblättern nicht ausschließlich von den Wasserstoffbrückenbindungen im Rückgrat, sondern zusätzlich von weitreichenden Wechselwirkungen zwischen AS-Resten und Nachbarsträngen [6, 7, 5, 8] abhängig. Es spielen Wechselwirkungen wie Salzbrücken [9], sterische Faktoren [10], benachbarte Seitenketten [11, 12], Kationen-Aromat-Wechselwirkungen [13] und hydrophobe Wechselwirkungen [14] eine Rolle.

Die antiparallele Form der β -Faltblätter ist in Proteinen häufiger zu beobachten, da für parallele β -Faltblätter große, thermodynamisch ungünstigere Schleifen nötig sind.

Eine sich ähnelnde topologische Gesamtanordnung von Sekundärstrukturelementen charakterisiert einen Domänenfaltungstyp. In der Arbeit von Holm et al. [3] werden die 20 häufigsten Domänenfaltungstypen, zum Beispiel α/β -Domänen, Coiled Coils, Actinfaltung oder α/β -Meander gezeigt. Die relative Stellung von Sekundärelementen in Domänen bildet die Tertiärstruktur. Diese wird durch nichtkovalente Wechselwirkungen, wie Van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen, Salzbrücken, Stabilisierung über Metallionen oder kovalente Bindungen wie Disulfidbrücken gebildet. Damit ist die räumliche Struktur des Proteins (bestehend aus mehreren Domänen) definiert. Die dreidimensionale Struktur führt dann zu einer festgelegten Funktion. Neuere Untersuchungen [15, 16] ergaben, dass in Proteinen lange Bereiche auch unstrukturiert und isoliert erscheinen, was zu einer partiellen Variabilität der Funktion führt. Erst durch die Bindung ergibt sich die Struktur (induced fit) [2, 17]. Die Protein-Protein-Wechselwirkungen (ein Ligand bindet an eine Domäne) bilden dann die Quatärstruktur aus [18].

In dieser Arbeit soll die Faltung, Stabilität und das Bindungsverhalten kleiner β -Faltblättern untersucht werden. Die kleinste, in der Natur vorkommende, stabile, antiparallele β -Faltblattstruktur ist eine Proteininteraktionsdomäne (PID): die WW-Domäne. Diese eignen sich durch ihre Stabilität und geringe Größe ideal zur Untersuchung von Bildung, Stabilität, Funktion und Faltungsmechanismen von β -Faltblättern [19, 20].

3.2 Biophysikalische Methoden zur Analyse von β -Faltblattstrukturen

Die biophysikalische Untersuchung von β -Faltblattstrukturen soll bei der Beurteilung von Stabilität, Faltungsstatus und Bindung zum Liganden helfen. Dazu dienen verschiedene Methoden.

CD-Spektroskopie (*circular dichroism* (Zitrkulardichroismus))

Bei der CD-Spektroskopie wird links- und rechtspolarisiertes Licht durch ein chirales Medium geschickt. Die Absorption ist an chiralen Zentren unterschiedlich und ergibt ein Signal. Die Spektren zeigen für Sekundärstrukturen in Peptiden und Proteinen spezifische Kurven, so dass es möglich ist, eine Aussage über den Faltungszustand des Peptids zu treffen.

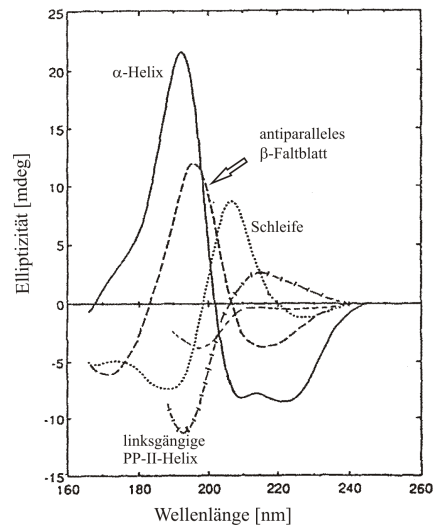


Abbildung 3.1: Beispiele für typische CD-Spektren von Sekundärstrukturen von Peptiden

Mittels eines Temperaturgradienten lässt sich der Schmelzpunkt eines Oligopeptids (die Temperatur, bei der die Hälfte des Peptids denaturiert ist) bestimmen. Damit kann man die Stabilität eines Peptids definieren.

NMR-Spektroskopie

(nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz))

Der Faltungszustand eines Peptides lässt sich auch mit Hilfe der NMR-Spektroskopie bestimmen. Eine Faltung erkennt man im 1D-NMR-Spektrum an diskreten, scharfen Signalen. Sind Signale beispielsweise von Aromaten nicht vorhanden, so kann das ein Zeichen dafür sein, dass diese Seitenketten frei beweglich sind. In einem solchen Fall liegt keine Faltung vor.

SPR-Spektroskopie

(surface plasmon resonance (Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie))

Die Bindung eines Peptides an einen Liganden kann mittels SPR-Spektroskopie untersucht werden. Bei dieser Methode wird eine Komponente (hier ein Peptid) immobilisiert und die an andere, bindende Komponente (hier eine Domäne) gelöst in einem Puffer darüber geleitet. Bindet eine Domäne an den auf dem Chip immobilisierten Peptid, ändert sich die Masse und damit auch der Brechungsindex am Chip. Dieser kann gemessen werden. Durch eine Konzentrationsreihe wird dann die Bindungskonstante bestimmt.

ITC

(isothermal titrations calorimetry (Isothemische Titrationskalorimetrie))

Bei dieser Methode wird die Wärme gemessen, die bei einer Reaktion abgegeben oder aufgenommen wird. Zum Beispiel kann damit die Bindungskonstante einer Domäne bezüglich eines Liganden bestimmt werden. Gleichzeitig erhält man die enthalpischen und entropischen Beiträge zu dieser Reaktion.

3.3 Proteinfaltung und Fehlfaltung

Einige Krankheiten, wie zum Beispiel Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) [21, 22], Alzheimer [23, 24], Typ 2 Diabetes Mellitus [25] oder Chorea Huntington [26] werden als sogenannte Faltungskrankheiten bezeichnet. Allen diesen Krankheiten ist eines gemein: Ein bestimmtes Protein wird aus seiner nativen Struktur in eine β -Faltblattstruktur umgewandelt, die dann oft unlöslichen Amyloide bildet [27]. Diese Umwandlung ist zumeist irreversibel und verursacht zum Beispiel neuronale Schädigungen. Bisher sind die Ursachen für die spontane Fehlfaltung von Proteinen nicht bekannt. Gut untersucht sind dagegen Punktmutationen [28, 29], zu hohe oder zu niedrige Konzentrationen von Metallionen in der Umgebung der Proteine [23], Änderungen des pH-Wertes [30, 31] oder der Temperatur [32], oxidativer Stress [25] oder kleine chemische Verbindungen, wie Aldehyde, die fähig sind, unerwünschte Querverbindungen in Proteinen zu induzieren [33]. Es wird auch angenommen, dass ein fehlgefaltetes Protein als Kristallisationskeim fungiert und so die Amyloidbildung ausgelöst wird [34]. Die Frage dabei ist: Welcher Vorgang ist nun entscheidend für die Aggregation, oder sind die Amyloide vielleicht doch nicht die Ursache für Faltungskrankheiten? Neueste Untersuchungen zur Alzheimer-Krankheit zeigen, dass schon Vorläufer-Aggregate und nicht die amyloiden Ablagerungen selbst zu Nervenschädigungen führen [35, 36].

Grundlegende Fragen nach den beeinflussenden Faktoren der Proteinstabilität in Zusammenhang mit deren Funktion sind weiterhin von hohem wissenschaftlichen aber auch anwendungsbezogenem Reiz. Die Sekundärstruktur der α -Helix ist, da sie auch in isolierten Strukturen stabil vorliegt (lokale i und $i+4$ Intrakettenwechselwirkung), gut untersucht. Zudem lässt sich eine gut lösliche, und damit einfach zu untersuchende α -Helix mit geringem Aufwand entwerfen [37, 38]. In β -Faltblättern dagegen ist die Struktur, neben den Wasserstoffbrückenbindungen des Rückgrates, von weitreichenden Wechselwirkungen zwischen AS-Resten der Nachbarstränge [6, 7, 5, 8] abhängig. Verschiedene Wechselwirkungen, wie Salzbrücken [9], sterische Faktoren [10], benach-

barte Seitenketten [11, 12], Kationen-Aromat-Wechselwirkungen [13] und hydrophobe Wechselwirkungen [14] spielen dabei eine Rolle. Um β -Faltblattstrukturen untersuchen zu können, würden sich kleine *de novo*- β -Peptide anbieten, die jedoch oft zur Fibrillenbildung neigen [39]. Dies ist aber nur für spezielle Amyloidbildungsuntersuchungen erwünscht [40, 41]. Für eine allgemeine Untersuchung von β -Peptiden ist eine gute Löslichkeit jedoch unabdingbar. Gut lösliche *de novo*-Peptide [42] haben aber den Nachteil, dass sie die Funktionalität in biochemischen Prozessen schlecht wiedergeben. So eignen sich kleine Proteindomänen, wie zum Beispiel die dreisträngigen WW-Domänen besser für Untersuchungen von Stabilität und Funktionalität.

3.4 WW-Domänen

Im speziellen Fall der Signaltransduktion spielen Protein-Protein-Wechselwirkungen, wie sie durch die Proteininteraktionsdomänen (PID) vermittelt werden, eine tragende Rolle. Eine ganze Reihe von PIDs sind inzwischen bekannt und charakterisiert, darunter die SH2-, SH3-, PDZ- und WW-Domänen [43, 44, 45]. Diese PIDs erkennen kurze lineare Sequenzen ihrer Bindungspartner in ihrer Bindungstasche als Rezeptor. Einer dieser Typen von PIDs ist die etwa 30-40 AS lange WW-Domäne.

WW-Domänen sind sogenannte Protein-Protein-Interaktionsmodule, die in vielen Signalproteinen zu finden sind. Sie kommen in einer großen Menge an Eukaryonten (allerdings nicht in Prokaryonten) vor, von der Hefe über die Maus bis zum Menschen [46] (Tabelle 3.1). Oft sind zwei oder mehr WW-Domänen in einem Protein zu finden. Wird die Funktion durch Zusammenwirken zweier WW-Domänen ausgelöst (beispielsweise durch eine Induktion der Faltung einer Domäne durch die räumliche Nähe der anderen), spricht man von einer Tandem-WW-Domäne [47, 48].

Spezies	Anzahl der WW-Domänen im Lebewesen	verteilt auf Anzahl der Proteine
Hefe	9	6
Maus	143	78
Mensch	175	96

Tabelle 3.1: Verteilung der WW-Domänen

Die WW-Domäne ist das kleinste, stabile, in der Natur vorkommende dreisträngige, antiparallele β -Faltblatt (Abbildung 3.2). Sie benötigt keine Cysteinbrücken oder Metallionen zur Stabilisierung. Namensgebend sind die beiden hochkonservierten Tryto-

phane, die 20 - 22 AS-Reste voneinander entfernt liegen [49, 50, 51, 52, 19]. Bisher gut untersuchte Beispiele für WW-Domänen sind die *hYAP65* [51], *Nedd4* [53], *PIN1* [54] und *FBP28* (aus dem Protein *CA150*) [55].

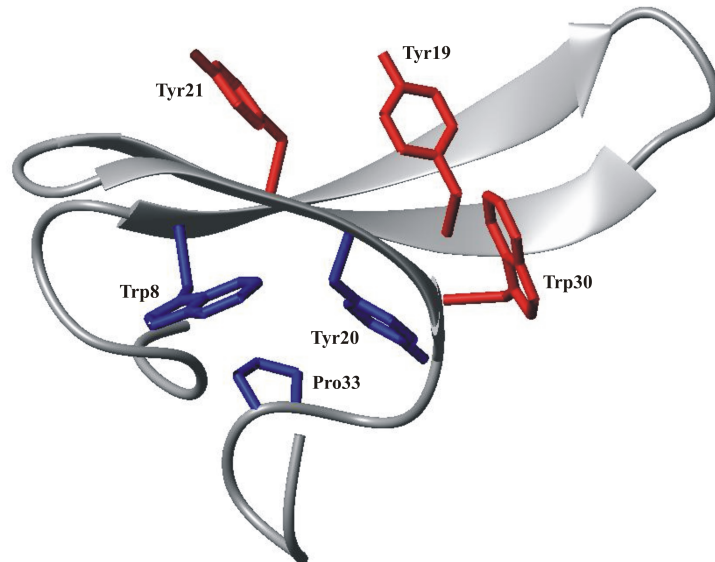


Abbildung 3.2: Prototyp [55] der WW-Domäne (Protein Datenbank (PDB) 1E0M). Das für WW-Domänen typische dreisträngige β -Faltblatt ist hier grau dargestellt. Die hervorgehobenen Reste zeigen die hydrophoben Cluster. Rote Reste = wichtig für die Ligandenbindung (konkave Seite)
Blaue Reste = wichtig für die Stabilität (konvexe Seite)

WW-Domänen binden, wie auch SH3-Domänen, EVH1-Domänen, GYF-Domänen oder UEV-Domänen [56, 57, 58, 43] an prolinreichen Motiven. Prolinreiche Sequenzabschnitte bilden in der Regel L-Polyprolinhelices aus, die in zwei Formen auftreten [59, 60]. Die Polyprolinhelix vom Typ I ist rechtsgängig, hat 3,3 Prolylreste pro Windung und ist cis-amidisch verknüpft. Die Polyprolinhelix vom Typ II ist linksgängig, hat 3 Prolylreste pro Windung und ist trans-amidisch verknüpft (Abbildung 3.3). Gewöhnlich findet man in Proteinen den Typ II. Wenn nicht genügend Proline vorhanden sind, bilden auch Polyglycine, Polylysine, Polyglutamate oder Polyaspartate die Struktur einer PPII-Helix [60].

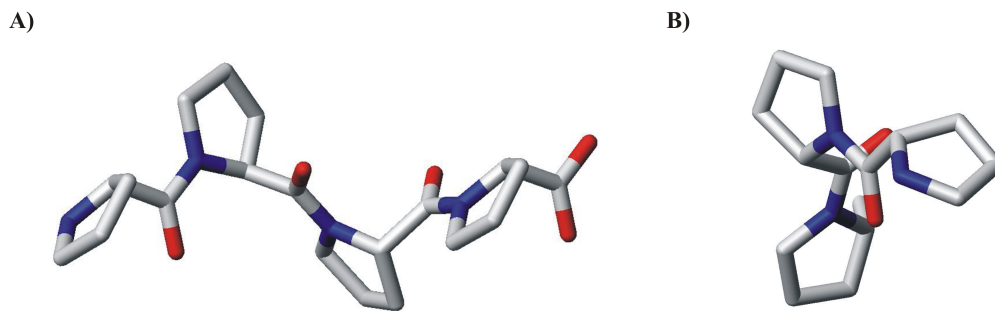


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung einer Polyprolin-II-Helix (PPII-Helix)

A) Seitenansicht einer PPII-Helix

B) Draufsicht auf die imaginäre Achse, um die sich die Helix windet

Die WW-Domäne erkennt Polyprolinhelices vom Typ II. Die Bindung des Liganden findet auf der konkaven Seite der Domäne statt (Abbildung 3.4).

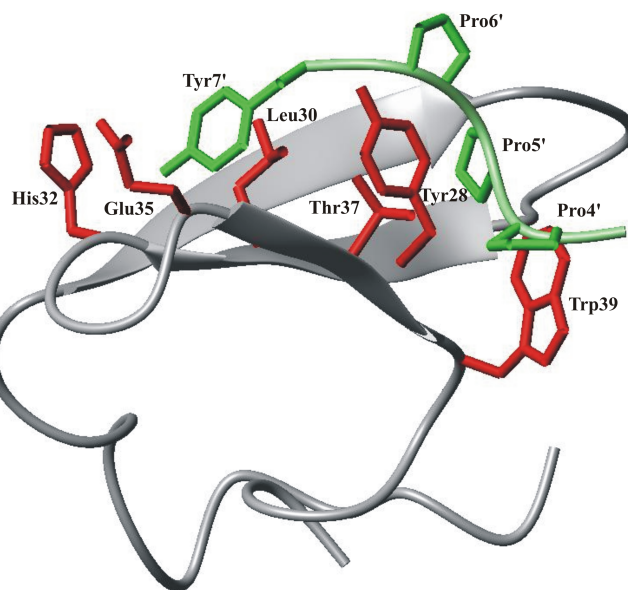


Abbildung 3.4: Komplex-NMR-Struktur der hYAP65 WW-Domäne mit Polyprolinligandmotiv PPPY (PDB: 1JMQ). Das für WW-Domänen typische dreisträngige β -Faltblatt ist grau dargestellt. Die roten Reste stellen die Bindungstasche dar und die grünen Reste die Bindungsstellen des Polyprolinliganden.

Die Bindungsspezifitäten der WW-Domänen sind unterschiedlich und wurden von Otte et al. [61] in fünf Gruppen eingeteilt, die Y-Gruppe, R_a- und R_b-Gruppe, L-Gruppe, Poly-P-Gruppe und Phosphor-S/T-Gruppe. Oft stabilisiert oder induziert der Ligand die Faltung einer isolierten WW-Domäne. Dies ist vor allem für die *hYAP65* bekannt [62].

WW-Domänen sind in einer Vielzahl von biochemischen Vorgängen involviert, wie zum Beispiel Regulierung des Zellzyklus [63, 64, 65], Spleißen von RNA [66, 67, 47], Transkription [68, 69, 70, 71, 72], Vermittlung von Zytoskelett-Membran-Interaktionen [73, 74] und den Ubiquitin-vermittelten Abbau von Proteinen [75, 32]. Zudem wird angenommen, dass die WW-Domänen an diversen Krankheiten [45] beteiligt sind, wie zum Beispiel Liddle Syndrom [75, 76], Duchenne Muskeldystrophie [73], Alzheimer [77, 78], Chorea Huntington [79], Krebs [80, 81] und Golabi-Ito-Hall-Syndrom [82].

3.5 Untersuchung der Faltung, Stabilität und des Bindungsverhaltens

Zur Untersuchung der Faltung, Stabilität und des Bindungsverhaltes bietet die Insertion von verschiedenen natürlichen AS [83, 84] in eine Proteindomäne die Möglichkeit, die Faltung [19], die Stabilität [20] und/oder Bindungseigenschaften bezüglich des Liganden [85, 86, 87, 88] zu verändern. Dies geschieht zum Beispiel durch gegenseitigen Austausch von Aromaten (Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan), aliphatischen Alkoholen (Serin, Threonin) oder basischen Resten (Arginin, Lysin). Die Unterschiede in den physikochemischen Eigenschaften sind gering, können aber die Empfindlichkeit einer bestimmten Position im Protein aufzeigen. Es können aber auch intensivere Mutationen durchgeführt werden, indem man physikochemische Eigenschaften stark verändert (z.B. Austausch von Tyrosin gegen Alanin). Diese Veränderung kann dazu führen, dass die Ligandbindungsstelle so abgeändert wird, dass der Ligand nicht mehr binden kann. Eine andere mögliche Veränderung ist die Störung der Gesamtstabilität der Domäne, die einen Verlust der ursprünglichen Faltung zur Folge haben kann. Die Gesamtheit dieser Mutationen gibt dann über den Einfluß der einzelnen Positionen auf das Faltungsverhalten, die Stabilität und das Bindungsverhalten Auskunft. Der Einsatz von unnatürlichen AS ist genauso aufschlussreich [89, 90, 19, 91, 92, 93]. Hier eröffnet sich die Möglichkeit, natürliche AS minimal zu verändern, zum Beispiel eine Seitenkette um eine CH₂ zu verlängern oder zu verkürzen (Lysin und Ornithin) oder aus einem Aromaten einen Nichtaromaten unter Erhalt der zyklischen Struktur

zu generieren (Phenylalanin und Cyclohexylalanin). Damit kann man die Auswirkung kleinster Veränderungen untersuchen. Eine dritte Möglichkeit zur Untersuchung der Faltung, der Stabilität und des Bindungsverhaltens einer Domäne ist die Veränderung des Rückgrates [94, 19, 95]. Es ist bekannt, dass in β -Faltblättern zwei Kräfte zur Stabilität und Funktion beitragen: Seitenkettenwechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Rückgraten der einzelnen β -Stränge. Bei den ersten beiden Methoden wurden nur die Auswirkungen bezüglich der Seitenketten betrachtet. Die Möglichkeit der Veränderung des Rückgrates heißt Veränderung im Bereich der Wasserstoffbrücken. Je nach Mutation der Amidbindung des Rückgrates entfällt eine oder beide Wasserstoffbrückenbindungen (siehe Abbildung 3.5).

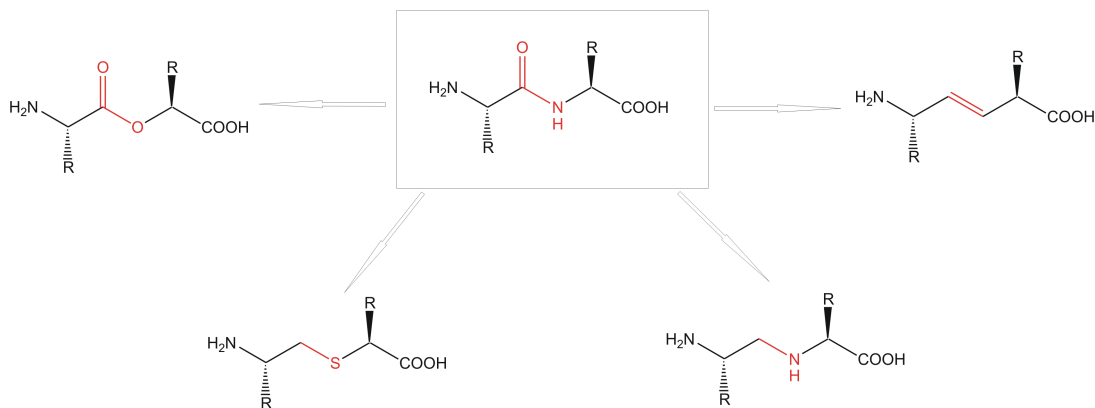


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Möglichkeiten der Rückgrat-Mutationen in einem Dipeptid.

Bezeichnung der Bindung zwischen den AS: Mitte (Amid-Bindung), links beginnend, gegen den Uhrzeigersinn (Ester-, Methylthioether-, Methylamin-, E-Alkenbindung)
R = beliebiger AS-Rest

Ferguson et al. [94] untersuchten zum Beispiel die Auswirkungen des Einbaus eines Methylthioether-Isosters in die erste Schleife der *hYAP65* WW-Domäne. Die allgemeine Struktur des β -Faltblattes blieb erhalten, mit einer durch die geringe Starrheit der Methylthioetherbindung erhöhten Flexibilität in diesem Bereich. Ein anderes Beispiel für Rückgratmutationen wurden von Deechonkit et al. [95, 96, 97, 98] durchgeführt. Dabei wurde an jeder Position der PIN1 WW-Domäne statt einer Amid-Bindung eine Ester-Bindung eingeführt und so für jede Einzelmutante an der entsprechenden Stelle die Möglichkeit, eine Wasserstoffbrückenbindung auszubilden, ausgeschaltet. Der Stickstoff der Amid-Bindung wurde von einem Wasserstoffbrücken-Donor zu einem

Ester-Sauerstoff und damit zu einem schwachen Wasserstoffbrücken-Akzeptor. Dabei waren alle Ester-Varianten monomer und ähnlich zum Wildtyp gefaltet. Auch die Affinität zum Liganden war ähnlich. Generell wird aber die Struktur destabilisiert. Dabei ist der Effekt der entfernten Wasserstoffbrücke in der Nähe des hydrophoben Kerns größer als an den Termini [96].

3.6 Peptidsynthese als Werkzeug für die Analyse der Faltung, Stabilität und des Bindungsverhaltens

Die Funktion einer Proteindomäne ist immer an ihre Struktur gebunden, welche wiederum von der Reihenfolge der AS (Primärstruktur) abhängig ist. Einige Untersuchungen zu Proteininteraktionen nutzten die Methode des Alanin-Scans (Mutagenese) [99]. Diese Methode ergibt jedoch nur eine kleine Zahl von Domänenanaloga, so dass die Alaninsubstitutionen nicht besonders aussagekräftig für eine vollständige Charakterisierung der Domänenstruktur sind [100]. Der entscheidende Nachteil des Austauschs der einzelnen Positionen durch Alanin ist das Einführen von nur einer Methylgruppe, die zwar verschiedene nichtkovalente Wechselwirkungen stören, aber die Gesamtstabilität nicht beeinflussen kann [101]. Mehr Informationen über die strukturellen Anforderungen für Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen können mittels des Ansatzes der Substitutionsanalyse ermittelt werden (siehe auch Abschnitt 2.2). Hierbei wird jede Position der Sequenz gegen jede gencodierte AS ausgetauscht. Die dabei entstehende große Menge an Domänenanaloga erfordert eine Methode der hoch parallelen Peptidsynthese. In den letzten zwanzig Jahren erwies sich die SPOT-Synthese als hierfür brauchbares und erfolgreiches Konzept [102, 103, 104, 105] und ist für eine komplette Substitutionsanalyse gut geeignet [106, 107, 108]. Der große Vorteil der SPOT-Technologie ist die große Anzahl der Peptide, die in kurzer Zeit und ausreichender Qualität als membranboundene Peptidfelder (Arrays) [103] generiert und direkt auf der Membran auf Proteininteraktionen untersucht werden können [104, 105].

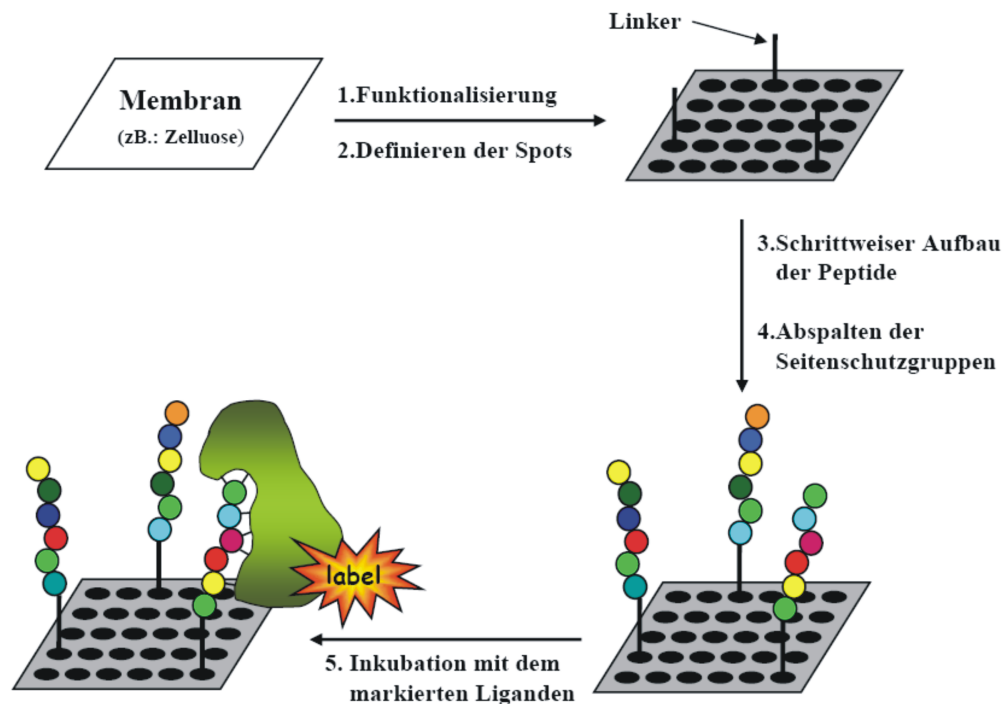


Abbildung 3.6: Fließschema der SPOT-Synthese.

Desweiteren ist diese Methode auch für Proteomics-Untersuchungen geeignet [109, 110]. Substitutionsanalysen wurden überwiegend für kurze Peptide durchgeführt und es konnte gezeigt werden, dass ihre Resultate eine semiquantitative Auswertung zulassen [108, 111]. In den Arbeiten von Toepert et al. [62] und Bhargava et al. [112] wurden komplette Substitutionsanalysen einer Proteindomäne (*hYAP65* WW-Domäne) bzw. eines langen bioaktiven Peptides mittels der SPOT-Technologie beschrieben.

Mit der Durchführung von Studien auf der Basis der SPOT-Technologie können Hinweise auf Peptidsequenzen gewonnen werden, für die sich ausführliche biophysikalische Untersuchungen lohnen könnten. Zu diesem Zweck müssen sie allerdings in ausreichender Menge synthetisiert werden. Hierfür steht die Festphasenpeptidsynthese (SPPS) nach Merryfield (ausführlich beschrieben in [113, 114]) zur Verfügung. Dabei wird mit der Fmoc/*t*Bu-Methode (Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, *t*Bu = *tert*-Butyl) gearbeitet [115]. Da in dieser Arbeit neben natürlichen AS auch unnatürliche AS eingebaut werden sollen, wird hier die SPPS der rekombinanten Methode, die eine Alternative zur Herstellung von Peptiden ist, vorgezogen.

3.7 Die FBP28 WW-Domäne

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die FBP28 WW-Domäne (*m*FBP28, PDB-Nr. 1E0L, "Formin-bindendes Protein") untersucht werden. Sie ist die zweite (WW2) von drei N-terminalen WW-Domänen im nuklearen Protein CA150, welches sowohl in der Maus als auch im Menschen vorkommt (Abbildung 3.7). Der Name leitet sich von "Coaktivator" mit einer Masse von 150 kDa ab [116]. Dieses Protein besitzt außerdem noch sechs FF-Domänen. Es ist ein Transkriptions-Elongations-Faktor und assoziiert mit dem RNA Polymerase II Holoenzym. Zudem ist es in Elongations- und Splicingprozessen involviert [117, 118]. Die 1. und 3. WW-Domäne des CA150-Proteins wurden in der Arbeitsgruppe "Molekulare Bibliotheken" von Livia Otte in ihrer Dissertation bezüglich ihres Bindungs- und Faltungsverhaltens untersucht [119]. Dabei konnte festgestellt werden, dass die WW1-Domäne ohne Ligand gefaltet ist, dagegen die WW3-Domäne nicht. Der WW3-Domäne konnte zudem auch keine Bindungsklasse nach Otte et al. [61] zugeordnet werden. Die WW1-Domäne bindet schwach an GPPPPBG (mit B = R, Q, E, I und *p*oT (= Phosphorthreonin)).

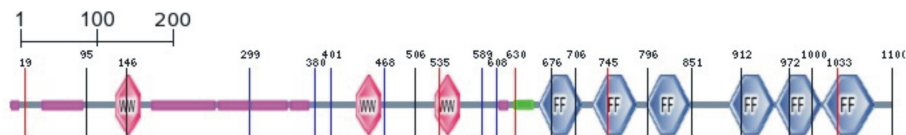


Abbildung 3.7: Modularer Aufbau des Proteins CA150 (Swiss-Prot-Datenbank-Nr.: Q8CGF7 (Maus), O14776 (Mensch), Schema aus der SMART-Datenbank). In diesem Protein sind drei WW-Domänen und sechs FF-Domänen vorhanden. Die zweite WW-Domäne entspricht der FBP28 WW-Domäne.

Das Protein CA150 beginnt mit einer Polyprolinsequenz [120]. Da WW-Domänen an solche binden, eröffnet sich sowohl die Möglichkeit der Selbstassoziation als auch die der Funktion als Ligand für andere WW-Domänen. Weiterhin wechselwirkt CA150 mit dem Huntingtin-Protein [121], da dieses ebenfalls eine Polyprolinsequenz enthält. Außerdem wurde CA150 in hoher Konzentration in Gehirngewebe von Huntington-Patienten gefunden [122]. Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, dass die FBP28 WW-Domäne bei höheren Konzentrationen Aggregate bilden kann [123]. Dies alles sind Indizien, die für einen Zusammenhang des Proteins CA150 mit der Faltungskrankheit Huntington sprechen.

Für diese Arbeit wurde die FBP28 WW-Domäne ausgewählt (Abbildung 3.8), weil sie mit 37 AS beispielsweise im Vergleich zu PDZ-Domänen (etwa 90 AS [124]) oder SH3-Domänen (60-70 AS [125]) recht klein und mit einem Schmelzpunkt von 61,8 °C [55] sehr stabil ist. Für aussagekräftige Ergebnisse der biophysikalischen Untersuchungen instabilerer Mutanten ist ein hoher Ausgangsschmelzpunkt für die allgemeinen Stabilitätsuntersuchungen von Vorteil. Im Gegensatz zur FBP28 WW-Domäne hat beispielsweise die *hYAP65* WW-Domäne einen Schmelzpunkt von 50,3 °C und der Prototyp der WW-Domäne von nur 44,2 °C. Der Prototyp der WW-Domäne wurde, basierend auf einem Netzwerk von hoch konservierten, weitreichenden Interaktionen, die sich über die β -Faltblattstruktur erstrecken, entwickelt [55].

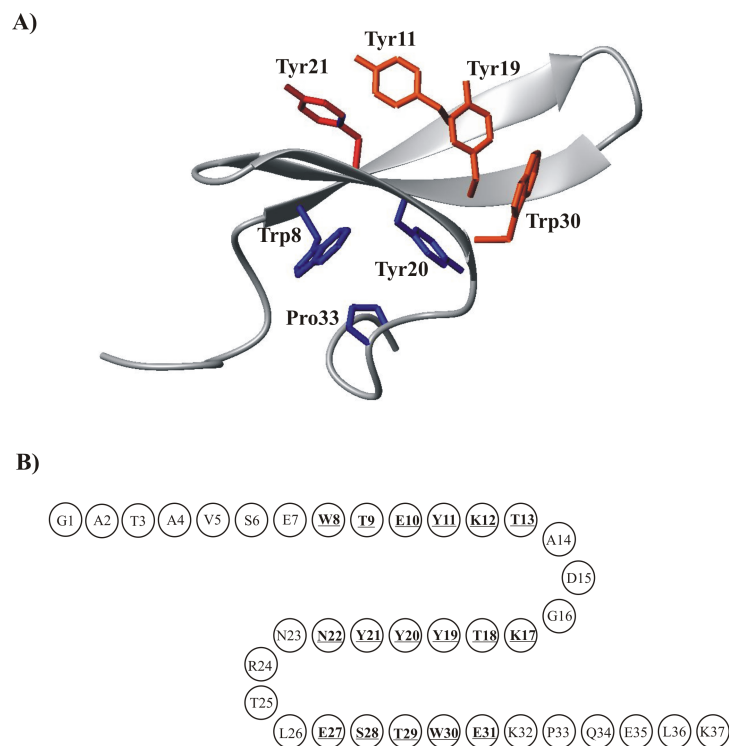


Abbildung 3.8: Darstellung der mFBP28 WW-Domäne

A) NMR-Struktur (PDB: 1E0L, [55]), β -Faltblatt dargestellt in grau, **blaue AS-Reste** zeigen den hydrophoben Cluster auf der konvexen Seite, wesentlich für die Stabilität der Domäne, **rote AS-Reste** bilden den hydrophoben Cluster auf der konkaven Seite, gleichzeitig auch die Ligandenbindungsseite

B) schematische Darstellung der Sequenz, unterstrichene AS stellen den Bereich des Faltblattes der Domäne dar

Die FBP28 WW-Domäne faltet autonom ohne Ligandeninduzierung und Cofaktoren. Dies verhindert eine Verfälschung der biophysikalischen Meßdaten durch Gleichgewichtsreaktionen, wie Binden von Liganden oder Cofaktoren oder Ausbilden von Disulfidbrücken und anschließendes Falten. Die FBP28 WW-Domäne hat außerdem die Eigenschaft in mäßig konzentrierten Lösungen ($>10 \mu\text{M}$ und $>50 \mu\text{M}$ unter 24 h) nicht zu aggregieren [126]. Damit eignet sie sich gut für Untersuchungen von Faltung und Stabilität in kleinen β -Faltblättern. Wie alle WW-Domänen besteht sie aus einem dreisträngigen β -Faltblatt. Die Länge beträgt, wie bereits erwähnt, 37 AS und wie bei allen WW-Domänen spielen hydrophobe AS-Rest, die Cluster ausbilden, eine wichtige Rolle für Stabilität und Funktion.

3.8 Festphasensynthese der FBP28 WW-Domäne

Alle 42 WW-Domänen aus der Arbeit von Otte et al. [61] ließen sich problemlos mittels SPPS herstellen. Bei der FBP28 WW-Domäne hingegen war das überraschenderweise nicht der Fall. Es gab zwei wesentliche Probleme. Zum einen bildete sich während der Synthese aufgrund der basischen Synthesebedingungen zwischen Asp15 und Gly16 ein Aspartimid [1, 127, 83]. Während der Fmoc-Abspaltung mit Piperidin entsteht daraus ein β -Piperidid [128] (siehe Abbildung 3.9).

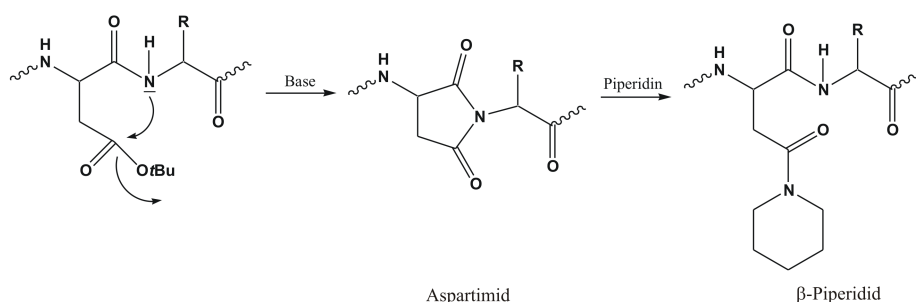


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Aspartimid-Bildung

Durch die basischen Bedingungen der Peptidsynthese ist es möglich, dass das freie Elektronenpaar des Stickstoffs des Glycins intramolekular am Carbonylkohlenstoff der benachbarten Aspartatseitenkette angreift. *OtBu* fungiert als Abgangsgruppe und es bildet sich ein Ring. Mit Piperidin entsteht durch Ringöffnung ein Piperidid [128].

In der Dissertation von Sandra Tremmel (FMP-Berlin, [1]) wurden zahlreiche Änderungen der Synthesebedingungen, wie zum Beispiel verschiedene Kupplungsreagenzi-

en (DIC/HOBT, TBTU/DIPA), diverse Reaktionszeiten, Lösungsmittel, stärkere Basen (DBU) oder $N\alpha$ -geschützte AS getestet. Diese konnten die Aspartimidbildung jedoch nicht vollständig verhindern, so dass alternativ anstelle eines Aspartats ein Asparagin an der Position 15 eingesetzt wurde. Damit wurde der gewünschte Effekt erzielt.

Ein Vergleich des wt mit der D15N-Variante der FBP28 WW-Domäne mittels NMR-Spektroskopie (durchgeführt von Henrik Holtmann, FMP-Berlin) ergab keine wesentlichen Veränderungen im zu untersuchenden Faltblatt (siehe Abbildung 3.10). Somit ist es möglich, aus Analysen zu Faltung, Stabilität und Bindungsverhalten an der Mutante direkte Rückschlüsse auf die Eigenschaften des wt zu ziehen.

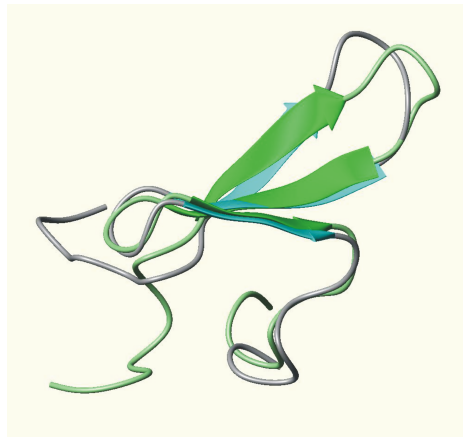


Abbildung 3.10: Vergleich der NMR-Spektren des wt der FBP28 WW-Domäne (hellblau) mit der D15N-Mutante (grün)

Das zweite Problem bestand im Auftreten von Abbruchsequenzen an der Position Asn22. Dies deutete auf die Ausbildung von störenden Sekundärstrukturen (β -Faltblatt) während der Synthese hin. Diese vorzeitige Faltung erschwert den Zugang der AS-Bausteine in folgenden Kopplungsschritten und führt damit zur Entstehung von Abbruch- bzw. Fehlsequenzen. Als Folge reduziert sich die Ausbeute auf ein Minimum.

Um dies zu verhindern, wurde die Methode der Pseudoproline angewandt [129]. Hierbei wird die Eigenschaft der Proline als Faltblattbrecher genutzt. Eine AS, wie Serin, Threonin oder Cystein wird so modifiziert, dass sie die Gestalt eines Prolins annimmt (siehe Abbildung 3.11) und auch dessen spezielle Eigenschaft des Brechen von β -Faltblattstrukturen übernimmt. Diese modifizierte AS wird als Dipeptid eingesetzt, um die Kopplungsneigung zu verbessern, da diese bei Prolinen und somit auch bei Pseudoprolinen (sekundäres Amin) schlechter ist, als bei den anderen AS. Nach dem Einbau

und kompletter Fertigstellung der Domäne wird mit der Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen durch TFA auch das Pseudoprolin gespalten und die ursprüngliche AS erscheint wieder (siehe Abbildung 3.11). Somit wurde die Faltung während der Synthese verhindert.

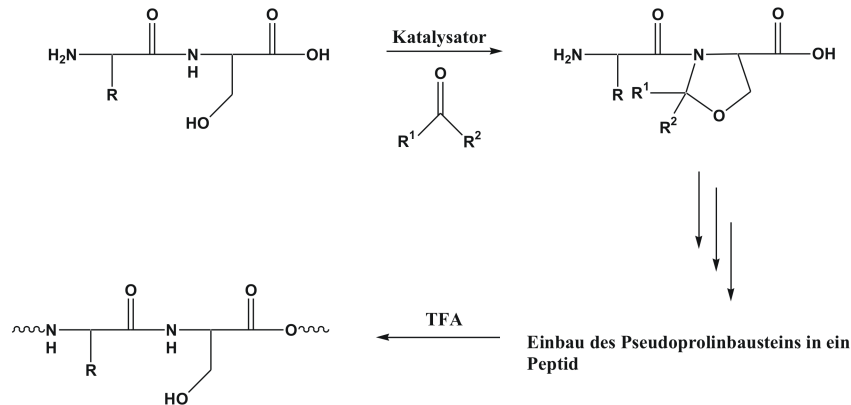


Abbildung 3.11: Prinzip der Pseudoprolin

Ein Serin (oder Threonin bzw. Cystein) reagiert katalysatorunterstützt mit einem Keton zu einem Ring, dem Pseudoprolin. Dieses fungiert, wie das Prolin, als β -Faltblattbrecher. Als Dipeptid lässt es sich besser mittels SPPS einbauen und verhindert durch die starre Ringstruktur die Bildung von Sekundärstrukturen während der Synthese. Mit der Abspaltung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen öffnet sich auch das Pseudoprolin. Die ursprüngliche Seitenkette (Serin, Threonin oder Cystein) erscheint wieder.

Der Einbau der Pseudoprolinbausteine sollte günstigerweise in der Nähe einer Schleife erfolgen. An diesen Stellen ist die Wirkung der Faltblattbrechung am größten. Sandra Tremmel [1] setzte daher zwei Pseudoprolinbausteine ein: in Position Glu27-Ser28 und Lys17-Thr18. Die Pseudoprolin werden als Fmoc-Glu(OtBu)-Ser($\Psi^{Me,Me}pro$)-OH und (Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{Me,Me}pro$)-OH bezeichnet. Dabei kennzeichnet $\Psi^{Me,Me}pro$ den Pseudoprolinring mit den beiden Methylgruppen R₁ und R₂ (siehe Abbildung 3.11).

Bis auf die letzten drei Kopplungsschritte konnte die Synthese der FBP28-D15N WW-Domäne auf diese Weise gut durchgeführt werden. Die Kopplungen wurden mit TBTU/HOBt bzw. HBTU/HOBt durchgeführt. Für die Kopplung der AS Thr3, Ala2 und Gly1 wurde auf HATU/DIPA zurückgegriffen (Abbildung 3.12).

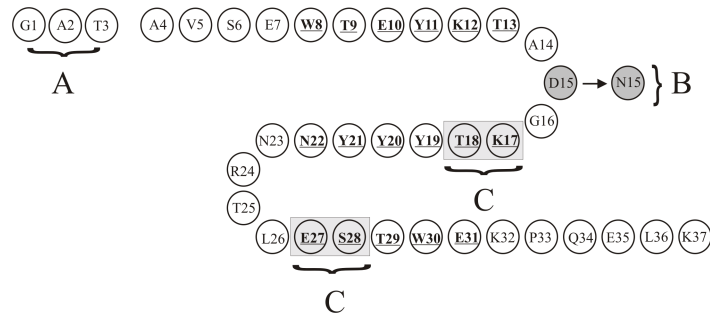


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung der Sequenz der FBP28 WW-Domäne mit den nötigen synthetischen Modifikationen.

- A) Kopplung dieser drei AS mit HATU/DIPA (sonst Kopplung mit TBTU/HOBt bzw. HBTU/HOBt)
- B) Austauschen der AS Asp15 gegen Asn15 zur Vermeidung der Aspartimidbildung
- C) Einsatz von Pseudoprolin-Dipeptidbausteinen an Position Lys17-Thr18 (Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{Me,Me_{pro}}$)-OH und Glu27-Ser28 Fmoc-Glu(OtBu)-Ser($\Psi^{Me,Me_{pro}}$)-OH