

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Festphasensynthese

#### 5.1.1 Chemikalien

Acetonitril	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure	Fluka (Sigman-Aldrich), Steinheim Deutschland
DCM (Dichlormethan)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Diethylether	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
DMF (Dimethylformamid)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Ethan-1,2-dithiol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Fmoc-AS-OH (natürlich):	NovaBiochem, Darmstadt, Deutschland und
E-, N-( <i>O</i> tBu); S-, T-, Y-( <i>t</i> Bu); K-,W-(Boc);	Bachem, Budendorf, Schweiz
N-, Q-, H-(Trt); R-(Pbf)	
Fmoc-AS-OH (unnatürlich):	NovaBiochem, Darmstadt, Deutschland und
Fmoc-4-Fluoroprolin, Hydroxy( <i>t</i> Bu)prolin	Bachem, Budendorf, Schweiz
Fmoc-Cyclohexylalanin	
Methylphenylsulfid	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
MTBE (Methyltertbutylether)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
NMM ( <i>N</i> -Methylmorpholin)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
NMP ( <i>N</i> -Methylpyrrolidon)	Fluka (Sigman-Aldrich), Steinheim Deutschland
Phenol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Piperidin	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Pseudoprolinbausteine	NovaBiochem, Darmstadt, Deutschland
PyBOP	NovaBiochem, Darmstadt, Deutschland
(Benzotriazol-1-yloxy)-tripyrrolidino- phosphoniumhexafluorophosphat)	
TentaGel S RAM-Harz	RAPP Polymere GmbH, Tübingen, Deutschland
TFA (Trifluoressigsäure)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland

### 5.1.2 Synthese

Die löslichen Peptide wurden mittels eines Syntheseautomaten (Syro2000, MultiSyn-Tech, Witten, Deutschland; AMS422, ABiMED, Langenfeld, Deutschland) hergestellt, wobei die Fmoc-Chemie verwendet wurde. Die Peptide wurden vom C-Terminus her aufgebaut. Dazu wurde entsprechend der Beladung Tentagel-Harz für einen 50  $\mu$ mol-Ansatz eingewogen. Es wurden Fmoc-AS-OH (in gleicher Weise die unnatürlichen AS und Pseudoproline), PyBOP (vierfacher Überschuß) und NMM (achtfacher Überschuss) eingesetzt. Die Konzentration der in DMF gelösten Edukte betrug 0,67 M Fmoc-AS-OH, 0,95 M PyBOP und 4 M NMM. Folgende Aminosäurederivate wurden in NMP gelöst: Arg, His, Phe und Pro. Zum Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe wurde 20 % Piperidin in DMF eingesetzt. Nach Beendigung der Synthese am Automat wurden die säurelabilen Seitenschutzgruppen und gleichzeitig das Peptid vom Harz mit einer TFA-Lösung (10 ml TFA; 0,75 g Phenol; 0,5 ml Aqua<sub>dest</sub>; 0,5 ml Methylphenylsulfid; 0,25 ml Ethan-1,2-dithiol) 3 h bei RT (Raumtemperatur) abgespaltet. Bei diesem Vorgang wurden ebenfalls die Pseudoproline gespaltet. Die Lösung wurde gefiltert und das Peptid zunächst mit MTBE bei -20 °C ausgefällt und abzentrifugiert (2 min bei 3200 rpm (Umläufe pro Minute)). Der Überstand wurde abdekantiert und verworfen und der Peptidrückstand dreimal mit Diethylether bei RT gewaschen und ebenfalls abzentrifugiert (2x2 min bei 3200 rpm und 1x6 min bei 5400 rpm). Die Rohpeptide lagen dann als C-terminales Amid und N-terminal als freies Amin vor. Zur Analyse und Reinigung der Rohpeptide wurde eine Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie (RP-HPLC, *reversed-phase high-performance liquid chromatography*; Waters, Eschborn, Deutschland) mit folgenden Bedingungen durchgeführt: linearer Lösungsmittelgradient (Lösungsmittel A: Wasser mit 0,05 % TFA; Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0,05 % TFA; Gradient 5-60 % B über 30 min); UV-Detektor (bei 214 nm, RP-18-Säule). Die Identifizierung der Peptide erfolgte mittels Matrixunterstützter Laserdesorption/Ionisations-Flugzeit Massenspektroskopie (MALDI-TOF-MS, *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*; VoyagerLT, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland, Matrix:  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure, Laser: Stickstoff bei 337 nm) und/oder Elektronensprayionisations-Flugzeit-Massenspektroskopie (ESI-TOF-MS, *electron spray ionization-time of flight*; Q-TOF<sub>micro</sub>, micromass, Manchester, Großbritannien).

## 5.2 SPOT-Synthese

### 5.2.1 Chemikalien

Acetanhydrid (2% in DMA)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Acetonitril	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Ameisensäure	Geyer, Berlin, Deutschland
Ammoniak (Gas)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
blocking buffer	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau (in Ethanol)	Fluka (Sigma-Aldrich), Steinheim Deutschland
Chemilumineszenz-Reagenz	Uptima, Montlucon, Frankreich
DCM	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
DIC (Diisopropylcarbodiimid)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Diethylether	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
DMA (Dimethylacetamid)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
DIPA (N-Ethyl-diisopropylamin)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Fmoc-AS-OPfp (natürlich):	NovaBiochem, Darmstadt, Deutschland und
E-, N-(OtBu); S-, T-, Y-(tBu); K-, W-(Boc);	Bachem, Budendorf, Schweiz
N-, Q-, H-(Trt); R-(Pbf)	
Fmoc-AS-OH (unnatürlich):	NovaBiochem, Darmstadt, Deutschland und
Fmoc-4-Fluoroprolin, Hydroxy(tBu)prolin	Bachem, Budendorf, Schweiz
HRP-Salz-Gemisch	Pierce, Rockford, IL, USA
(Meerrettichperoxidase-Salz-Gemisch)	
Konjugationspuffer	Pierce, Rockford, IL, USA
3-Maleimidopropionsäure	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NMI (N-Methylimidazol)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
NMP	Fluka (Sigma-Aldrich), Steinheim Deutschland
Phenol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Piperindin (20% in DMA)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Pseudoprolinbausteine	NovaBiochem, Darmstadt, Deutschland
TFA	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
TIBS (Triisopropylsilan)	Fluka (Sigma-Aldrich), Steinheim Deutschland
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland

## 5.2.2 SPOT-Synthese mit gängigen AS

Als Trägermaterial wurde eine 19x29 cm Whatman 50 Zellulosemembran (Whatman, Maidstone, Großbritannien) eingesetzt, um die Peptidbibliotheken darauf zu immobilisieren. Die Anordnung der Peptide als Substitutionsanalyse, Längenanalyse oder Ähnliches wurde mit einer gruppeninternen Software (LISA, Version 1.71) definiert. Die Oberfläche der Membran musste zunächst  $\text{NH}_2$ -funktionalisiert werden, indem  $\beta$ -Ala-OH durch Veresterung auf die OH-Gruppen der Zellulose gebunden wurde.

Für 60 ml:

Fmoc- $\beta$ -Ala-OH:  $M = 319,3 \text{ g/mol}$ ;  $c = 0,2 \text{ mol/l}$ ;  $m = 3,83 \text{ g}$

DIC:  $M = 126,2 \text{ g/mol}$ ;  $\rho = 0,81 \text{ kg/l}$ ;  $c = 0,24 \text{ mol/l}$ ;  $m = 1,817 \text{ g}$ ;  $v = 2243 \mu\text{l}$

NMI:  $M = 82,11 \text{ g/mol}$ ;  $\rho = 1,035 \text{ kg/l}$ ;  $c = 0,4 \text{ mol/l}$ ;  $m = 1,97 \text{ g}$ ;  $v = 1904 \mu\text{l}$

Mit dieser Lösung wurde die gesamte Membran in einer Metallschale über Nacht inkubiert und mit folgenden Wascheschritten behandelt:

3 x 2 min DMA

Zur Bestimmung der Grundbeladung der Membran wurden nach der Funktionalisierung 3 Spots ( $0,25 \text{ cm}^2$ ) ausgestanzt und mit je einem Milliliter 20%igem Piperidin 20 min inkubiert. Mit einem Photometer (Ultrospec3000, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) wurde die Fmoc-Absorption bei 301 nm ( $\epsilon = 7800 \text{ l/mol*cm}$ ) gemessen, und damit auch die Beladung der Membran bestimmt. Die Grundbeladungen betragen zwischen 40 und 120 nmol/Spot.

20 min 20 %iges Piperidin

5 x 2 min DMA

3 x 2 min Ethanol

1 x 2 min Bromphenolblau in Ethanol

2 x 2 min Ehanol; 2 x 1 min Diethylether

Die in NMP gelösten Fmoc-AS-OPfp-Derivate ( $c = 0,3 \text{ M}$  bzw.  $0,4 \text{ M}$ ) wurden dann mittels eines SPOT-Roboters (INTAVIS AG, Köln, Deutschland) aufgebracht. Nach der ersten Schicht wurden die verbleibenden freien  $\text{NH}_2$ -Gruppen mit Acetanhydrid blockiert und damit die Spots definiert. Es folgen Waschschrirte:

2 %ige Acetanhydridlösung in Metallschale geben und die Membran mit den Spots nach unten legen, 3 min ohne Schütteln inkubieren

30 min 2%ige Acetanhydridlösung mit 1% DIPA

5 x 2 min DMA  
20 min 20 %iges Piperidin  
5 x 2 min DMA; 3 x 2 min Ethanol  
1 x 2 min Bromphenolblau in Ethanol  
2 x 2 min Ethanol  
2 x 1 min Diethylether

Nach jedem weiteren Kopplungszyklus wurden die Waschschr itte wie nach der Funktionalisierung (ohne Beladungsbestimmung) angewandt. Zur Abspaltung der säurelabilen Seitenschutzgruppen wird eine TFA-Mischung in folgender Weise verwendet:

0,5 g Phenol; 1 ml Aqua<sub>dest</sub>; 1,5 ml TIBS; 2,5 ml DCM; 45 ml TFA  
30 min, Inkubation ohne Schütteln  
4 x 3 min DCM  
3 x 2 min DMA  
2 x 2 min Ethanol  
2 x 1 min Ether

0,5 g Phenol; 1 ml Aqua<sub>dest</sub>; 1,5 ml TIBS; 22,5 ml DCM; 25 ml TFA  
2,5 h, Inkubation ohne Schütteln  
4 x 3 min DCM  
3 x 2 min DMA  
2 x 2 min Ethanol  
2 x 1 min Ether

### 5.2.3 SPOT-Synthese mit nichtg angigen AS (Pseudoprolin, unnatürliche AS)

Unnatürliche AS und Pseudoprolinbausteine waren nicht als OPfp-Ester erhältlich. Daher mussten sie extra aktiviert werden. Dies geschah mittels EEDQ (2-Ethoxy-1-ethoxy-carbonyl-1,2-dihydrochinolin) 0,6 M Lösungen der entsprechenden AS und EEDQ wurden 1:1 5 min gemischt und dann die aktivierte AS-Lösung auf die Membran mittels des SPOT-Roboters aufgebracht. Zu beachten war hierbei, dass während der Aktivierung CO<sub>2</sub> entsteht und dadurch im Dilutorschlauch größere Mengen an Luftblasen entstehen können, die dann das Spot-Ergebnis beeinträchtigen können. Um dies zu verhindern, reicht es, die Reaktionslösung 5 min mit Ultraschall zu behandeln. Alle Waschschr itte wurden, wie bei der SPOT-Synthese mit gängigen AS beschrieben, durchgeführt.

### 5.2.4 Analytik der SPOT-Synthese

Zur Analyse wurden drei Spots mit je gleichem Peptid verwendet (Fläche je 0,25 cm<sup>2</sup>). Zuvor wurde die Membran mehrmals mit Aqua<sub>dest</sub> gewaschen, um Salze zu entfernen. Danach wurde der Membranabschnitt mit den Analysespots in einen Exikkator überführt, welcher zunächst evakuiert und danach mit Ammoniakgas gefüllt wurde. Damit konnten über Nacht die Esterbindungen amidiert werden und damit die Peptide von der Membran abgespalten werden. Nach Entfernen des Ammoniakgases wurden die Peptide von den Spots mit Aqua<sub>dest</sub> gewaschen (3 Spots auf einen Milliliter, 1 h schütteln). Die Peptidlösung konnte nun der Analyse zugeführt werden. Für die analytische RP-HPLC wurde die Peptidlösung unverdünnt eingesetzt und unter den Bedingungen, wie bei der Festphasensynthese auf Seite 35 beschrieben, gemessen. Die Identifizierung der Peptide erfolgte mittels ESI-TOF-MS. Dazu wurde 1 µl der Peptidlösung zu 5 µl einer Mischung aus Aqua<sub>dest</sub>:Acetonitril:Ameisensäure = 50 ml:50 ml:5 ml hinzugefügt. 1 µl dieser Verdünnung wurde für die Messung verwendet.

### 5.2.5 Koppeln von gereinigten Peptiden über eine Maleimidfunktion

Es gibt die Möglichkeit, auf maleimidaktivierte Membranen gereinigte Peptide über ein terminales Cystein zu koppeln. Hierfür benutzt man eine β-Alanin-Membran, auf der die Spots schon definiert sind (durch Acetylierung, siehe oben). Auf diese Membran wird zweimal eine Mischung aus 0,6 M Maleimidopropionsäure und 0,3 M DIC in DMA (15 min vorreagieren lassen) aufgetragen und 20 min reagieren gelassen. Gewaschen wird mit 5 x 3 min DMA und 3 x 3 min DCM. Anschließend können die in PBS (9,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,6 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 150 mM NaCl; pH 7,4; 1:10 verdünnt eingesetzt) gelösten Peptide (versehen mit einem terminalen Cystein) in gewünschten Konzentrationen (v = 1 µl) auf die vordefinierten Spots aufgebracht werden. Dies geschieht dreimal mit einer Reaktionszeit von 30 min. Die Membran wurde dann mit 3 x 3 min mit Aqua<sub>dest</sub> und 2 x 3 min PBS gewaschen. Danach wurden die verbliebenden Maleimidgruppen mit 0,3 M Mercaptoethanol in PBS 30 min bei RT deaktiviert. Anschließend wurden die Membran gründlich bis zum Verschwinden des typischen Mercaptoethanolgeruches mit PBS gewaschen. Es folgten 3 x 3 min Waschen mit Aqua<sub>dest</sub>, 2 x 3 min Ethanol und 2 x 1 min Ether.

## 5.2.6 Bindungsstudien

Um die Interaktion eines Peptides auf den membrangebundenen Peptiden visualisieren zu können, mussten erstere mit HRP (Meerrettich-Peroxidase (*horseradish-peroxidase*)) markiert werden. Die zu markierenden Peptide wurden über ein terminales Cystein (mit  $\beta A = \beta\text{-Ala}$  als Linker) mit dem an HRP gebundenen Maleimidosubstituent verknüpft. Dazu wurden 200 nmol des Peptides und 25 nmol HRP ( $M(\text{HRP}) = 40000$  g/mol; 1 mg HRP absolut entsprechen 5 mg HRP-Salz-Gemisch) in 900  $\mu\text{l}$  Aqua<sub>dest</sub> gelöst und zusätzlich 100  $\mu\text{l}$  Konjugationspuffer (wässrige Lösung von  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  und EDTA (Ethylendiamintetraacetat), pH 7,0) hinzugegeben. Diese Lösung wurde 1 h bei RT geschüttelt. Verbleibende, nicht abreagierte Maleimidogruppen wurden mit 1  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol 1 h bei RT unter Schütteln deaktiviert. Zum Schluss wurde die Reaktionslösung gegen TBS-Puffer (TRIS-gepufferte Salzlösung; 13,7 mM NaCl; 0,27 mM KCl; 5 mM TRIS, pH = 8,0) 12 h dialysiert.

Für die Bindungsstudien musste die Membran zunächst 10 min mit Ethanol und 3 x 10 min mit TBS gewaschen und dann 3 h mit einem Blockierungspuffer (für 50 ml Blockierungspuffer : 5 ml blocking buffer; 2,5 g Saccharose; 5 ml 10fach TBS (5 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 50 mM TRIS), auffüllen mit Aqua<sub>dest</sub>) behandelt werden, um unspezifische Wechselwirkungen zu verhindern. Das markierte Peptid wurde dann in dem gleichen Blockierungspuffer gelöst (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Um nicht gebundenes Peptid zu entfernen, wurde anschließend 4 x 10 min mit TBS gewaschen, um dann Bindungen zwischen den Peptiden mit einem Chemilumineszenz-Reagenz (Luminol/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in einem Lumi-Imager (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) zu visualisieren. Die Spot-Signalintensitäten wurden mittels der Software Genespotter (MicroDiscovery GmbH Berlin, Deutschland) analysiert und quantifiziert. Diese bestimmt die Intensität des Signals aus einer Kreisregion um das Zentrum des Spots, detektiert vom Bild der Membran. Das Hintergrundsignal wird mit einem Sicherheitsabstand von dieser Kreisregion bestimmt, das dann vom Spotsignal abgezogen wird. [111] Die so als positiv identifizierten Signale können dann ausgezählt werden.

## 5.3 CD-Messungen

### 5.3.1 Aufnahme der Spektren

Der Faltungszustand und Schmelzpunkt der Peptide wurde mittels CD-Spektroskopie an einem Jasco-J720 Spektropolarimeter (Jasco Corp., Hachioji, Japan) bestimmt. Die

Peptide wurden zu einer 50  $\mu\text{M}$  Lösung mit einem Phosphatpuffer ( $c = 30 \text{ mM}$ ; pH 7; Ionenstärke von 0,154 M durch 88 mM NaCl) verdünnt. Die tatsächliche Konzentration der Peptidlösung wurde photometrisch bestimmt (Aromatenabsorption bei 280 nm). Der dazu benötigte molare Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  wurde nach der Gleichung von Gill und Hippel berechnet [130]. Die Spektren wurden in einer 1 mm Quarzküvette von 260 nm bis 205 nm in Schritten von 0,5 nm aufgenommen. Die spektrale Bandbreite war 1 nm, die Abtastgeschwindigkeit betrug 100 nm/min und die Antwortzeit 1 s. Zudem wurden 14 Akkumulationen (14 Messungen, deren Spektren zu einem Spektrum gemittelt werden) ausgeführt. Messungen, die bei 4 °C aufgenommen wurden, repräsentieren den nativen Faltungszustand. Zur Kontrolle wurden auch Spektren bei 95 °C (ungefaltetes Peptid) und dann für die Überprüfung der Rückfaltung wieder bei 4 °C aufgenommen. Die Reversibilität der Faltung entsprach bei allen Domänenvarianten 80-90 %.

Um den Einfluss des Liganden durch Bindung auf die Domäne zu untersuchen, wurden zunächst Spektren von Domäne und Ligand unter den oben genannten Bedingungen aufgenommen. Die Konzentration der Domäne betrug wieder 50  $\mu\text{M}$  und des Liganden 150  $\mu\text{M}$ , um die Spektren vergleichen zu können. Dann wurde ein Spektrum mit beiden Komponenten unter gleichen Bedingungen in einer 1 mm-Küvette aufgenommen. Durch Übereinanderlegen der Kurven konnte so eine qualitative Auswertung gemacht werden.

### 5.3.2 Bestimmung der Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte (bei Peptiden und Proteinen die Temperatur, bei der die Hälfte des Peptids oder Proteins ungefaltet vorliegt) wurden bei einer konstanten Wellenlänge von 230 nm gemessen. Alle untersuchten Peptide waren WW-Domänen und diese haben ein verschobenes Maximum der  $\beta$ -Faltblattkurve bei 230 nm [131, 52]. Es wurde ein Temperaturgradient von 4 °C bis 95 °C gewählt. Die Heizrate betrug 50 °C/h und alle 0,2 °C wurden Daten mit einer Antwortzeit von 8 s aufgenommen. Auch hier wurden die Messungen in einer 1 mm Quarzküvette durchgeführt.

Die Schmelzpunkte der Komplexe (Domäne und Ligand PPPLIPPPPLPPPPPLIPPP-PLPP) wurden in einer 1 cm Quarzküvette und bei 290 nm bestimmt, da an dieser Stelle kein CD-Signal vom Liganden zu finden ist. Somit sind einzig das Signal des Komplexes und etwaiger unkomplexierter WW-Domänen vorhanden. Die Heizrate betrug auch hier 50 °C/h und alle 0,2 °C wurden Daten mit einer Antwortzeit von 8 s



aufgenommen. Die Konzentration der Domäne betrug wieder  $50 \mu\text{M}$  und des Liganden entsprechend den  $K_d$ -Werten aus den SPR-Messungen. Bei Domänen, die den Liganden nicht binden, wurde eine Konzentration von  $500 \mu\text{M}$  des Liganden PPPLIPPPPLPP-PPPLIPPPPLPP verwendet.

Unter Annahme eines geringen Fehlers wurde für alle WW-Varianten ein Wert für  $\Delta C_p$  der Literatur entnommen [94]. Über ein Gradientenverfahren wurde durch nichtlineare Kurvenanpassung mit den Parametern der Geraden der Schmelzpunkt ( $T_m$ ) [132] bestimmt.

## 5.4 SPR-Spektroskopie

Die Affinität des Liganden  $C\beta A\beta A$ -PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP ( $\beta A = \beta$ Alanin als Linker) zu den einzelnen WW-Varianten wurde mittels SPR-Spektroskopie auf einem BIAcoreX-System (Uppsala, Schweden) gemessen. Die Messungen wurden in Puffer ( $10 \text{ mM}$  2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES, pH 7,0),  $150 \text{ mM}$  NaCl,  $3 \text{ mM}$  EDTA,  $0,005 \%$  oberflächenaktiver Wirkstoff P20) durchgeführt. Der Ligand wurde auf einem CM5-Sensorchip (Messzelle) durch Thiolkopplung nach der Beschreibung der Hersteller immobilisiert. Nach der gleichen Methode wurde das Peptid LIEDNEYTARQGA- $\beta AC$  auf der Referenzzelle gebunden. Dieses wurde wegen der fehlenden Proline ausgewählt, was heisst, dass die FBP28-Varianten dieses Peptid nicht bindet. Für die Messungen wurden Verdünnungsreihen im Bereich von  $800 \text{ nM}$  bis  $800 \mu\text{M}$  angefertigt. Die Bedingungen für die Bindungsstudien waren eine Arbeitstemperatur von  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  und eine Pufferflussrate von  $15 \mu\text{l}/\text{min}$ . Die aufgenommenen Daten wurden mittels der Gleichgewichtsmethode des Programms BIAevaluation3.0 nach den 1:1 Modell nach Langmuir ausgewertet.

## 5.5 NMR-Spektroskopie

Die 1D-NMR-Spektren wurden von Henrik Holtmann am FMP-Berlin gemessen. Die Proben der Domänenvarianten wurden auf eine Konzentration von  $1 \text{ mM}$  in Puffer ( $20 \text{ mM}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;  $30 \text{ mM}$  NaCl;  $0,02 \%$  (Masse/Volumen)  $\text{NaN}_3$ ; pH 6) gebracht. Alle Messungen wurden entweder auf dem Bruker DRX600, dem Bruker AV900 oder dem Bruker DMX750 NMR-Spektrometer bei einer Temperatur von  $278 \text{ K}$  durchgeführt.

## 5.6 Synthese der Rückgrat-mutierten Bausteine

Alle Bausteine mit mutiertem Rückgrat wurden von Nina Bandur (Phillips-Universität Marburg in Zusammenarbeit in der DFG-Forschergruppe 475) hergestellt. Ein Tyrosin-Tyrosin-E-Alken-Isoster wurde in mehreren Stufen nach folgendem Syntheseprotokoll hergestellt [133]:

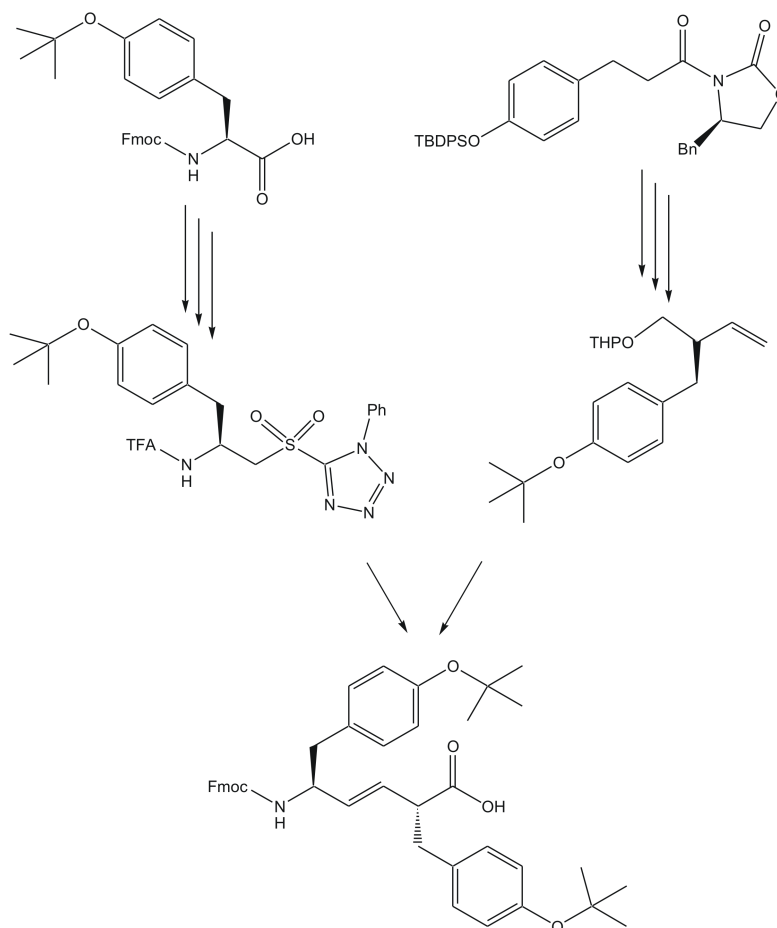


Abbildung 5.1: Synthese des E-Alkenisosters. Kurze Darstellung des Syntheseweges, jede gezeigte Stufe wurde in mehreren Schritten dargestellt. Das Endprodukt (Tyrosin-Tyrosin-E-Alken) kann mittels SPPS in ein Peptid eingebaut werden.

Das Tyrosin-Tyrosin-Methylenamin nach folgendem vereinfachten Syntheseprotokoll (Nina Bandur, persönliche Mitteilung) dargestellt:

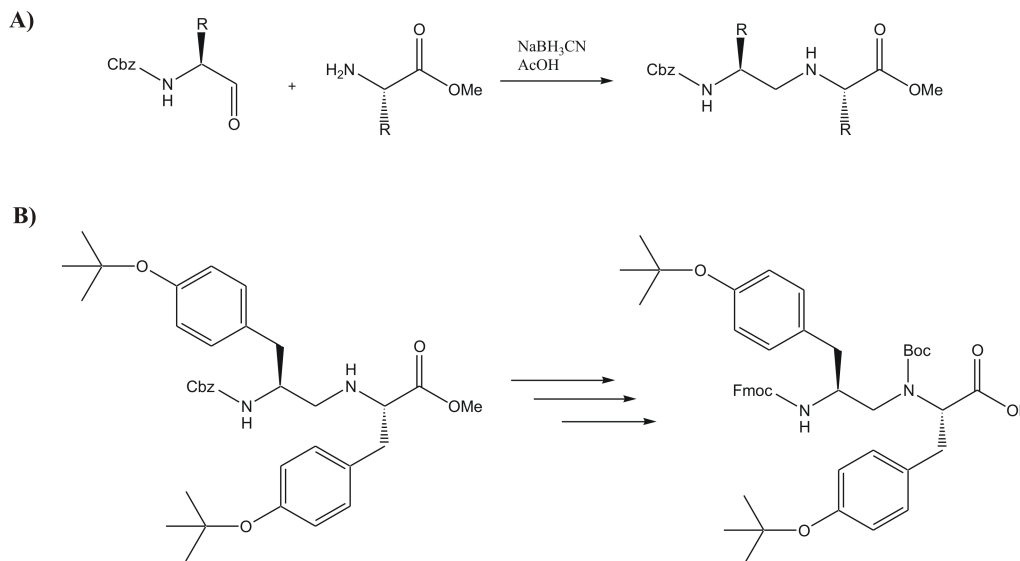


Abbildung 5.2: Synthese des Methylenamin-Isosters, durchgeführt von Nina Bandur (Phillips-Universität Marburg).

A) Knüpfen der Aminbindung durch reduktive Aminierung. R = beliebiger Rest

B) Umschützen des Tyrosin-Tyrosin-Methylenaminisosters in mehreren Stufen. Das Endprodukt kann dann mittels SPPS in ein Peptid eingebaut werden.

## 5.7 ITC-Messungen

Die ITC-Messungen (Isothermische Titrations-Kalorimetrie) wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Sandro Keller in einem "VP-ITC MicroCalorimeter" (MicroCal, Milton Keynes, Großbritannien) durchgeführt. Die Proben wurden in einem Phosphatpuffer ( $c = 30 \text{ mM}$ ;  $\text{pH } 7$ ; Ionenstärke von  $0,154 \text{ M}$  durch  $88 \text{ mM NaCl}$ ) auf die Meßkonzentration gebracht (WW-Domänen-Varianten  $c = 50 \mu\text{M}$  und der Polyprolinligand PPPLIPPPPLPPPPPLIPPPPLPP  $c = 500 \mu\text{M}$ ). Die Meßtemperatur betrug  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Es wurden 30 Injektionen à  $10 \mu\text{l}$  des Liganden 20 s in die Meßzelle titriert. Der Abstand zwischen Injektionen betrug 240 s und der der Datenaufnahme 2 s.