

**Development of a Screening System for the Systematic  
Evaluation of the Interactions of Fluoroalkyl-Substituted  
Amino Acids in Polypeptide Environments**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde  
Des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie  
Der Freien Universität Berlin

Eingereicht von  
Diplom-Biochemiker CHRISTIAN JÄCKEL  
aus Chemnitz, Deutschland

Juni 2006

1. Gutachterin: Prof. Dr. Beate Koksch
2. Gutachter: Prof. John T. Welch, Ph.D.

Tag der Promotion: 31. Oktober 2006

## Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Beate Koksch in der Zeit von April 2002 bis April 2006 an folgenden Instituten angefertigt:

- Institut für Organische Chemie der Fakultät für Chemie und Mineralogie der Universität Leipzig (April 2002 – Juni 2004)
- The Skaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA (Februar 2003 – August 2003)
- Institut für Chemie und Biochemie des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin (Juni 2004 – April 2006)

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel "*Development of a Screening System for the Systematic Evaluation of the Interactions of Fluoroalkyl-Substituted Amino Acids in Polypeptide Environments*", ohne Benutzung anderer als der zugelassenen Hilfsmittel selbstständig angefertigt habe. Alle angeführten Zitate sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt.

Berlin im Juni 2006  
Jäckel

Christian

Die Dissertation wurde in englischer Sprache verfasst.

Aus dieser Dissertation gingen bisher folgende Veröffentlichungen hervor:

- C. Jäckel, W. Seufert, S. Thust, B. Koksch, *ChemBioChem* **2004**, 5, 717-720.
- C. Jäckel, B. Koksch in *Fluorine-containing synthons* (Ed.: V. A. Soloshonok), ACS Symposium Series 911 **2005**, 611-635.
- C. Jäckel, B. Koksch, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4483-4503.
- C. Jäckel, M. Salwiczek, B. Koksch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4198-4203.

# Curriculum Vitae

## PERSONAL DATA

---

Name: Christian Jäckel  
Date of birth: 10.03.1978  
Place of birth: Karl-Marx-Stadt (Chemnitz)  
Marital status: Unmarried  
Nationality: German

## SCHOOL EDUCATION

---

09/1990 – 06/1996: *High School* *Chemnitz*  
“Special school for natural sciences, mathematics, and technics Hans Beimler” later renamed as “Johannes Kepler”, High School Degree received in June, 1996 (“Allgemeine Hochschulreife” Mark: 1.7)

09/1984 – 09/1990: *Elementary School* *Karl-Marx-Stadt (Chemnitz)*  
“Polytechnische Oberschule Wilhelm Firl” (1984-1986) and  
“Polytechnische Oberschule Johannes-R. Becher” (1986-1990)

## CONSCRIPTION

---

08/1996 – 08/1997: *Civilian service* *Chemnitz*  
Nursing service at “Zeisigwald” hospital, Chemnitz

## ACADEMIC EDUCATION

---

04/2002 – 04/2006: *Doctoral thesis research with Prof. Beate Koksche, University of Leipzig / Freie Universität Berlin:*  
*Graduation on 31.10.2006 (summa cum laude)*  
- Development of a screening system for the systematic evaluation of the interactions of fluoroalkyl-substituted amino acids in polypeptide environments

- 02/2003 – 08/2003: Research stay at The Scripps Research Institute (La Jolla, USA) with Prof. Carlos F. Barbas III.; implementation of phage display technology for the evaluation of fluorinated amino acids

10/2001-03/2002: *Diploma thesis research with Prof. Hans-Jörg Hofmann and Prof. Annette G. Beck-Sickinger, University of Leipzig:*

- Design of selective Neuropeptide Y-Y<sub>5</sub>-receptor ligands

10/1997 – 03/2002: *Studies of Biochemistry, University of Leipzig*

- Diploma in Biochemistry received in March, 2002 (Mark: 1.5)

- Intermediate diploma in Biochemistry received in August, 1999 (Mark: 2.3)

## PUBLICATIONS, TALKS AND POSTER PRESENTATIONS

---

### Publications:

C. Jäckel, M. Salwiczek, B. Kokschi. Fluorine in a native protein environment – How space filling and polarity of fluoroalkyl groups affect protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4198-4203.

C. Jäckel and B. Kokschi. Fluorine in peptide design and protein engineering. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *21*, 4482-4503.

C. Jäckel and B. Kokschi. Using the potential of fluorine for peptide and protein modification. In: V. Soloshonok (Ed.) *Fluorine-containing synthons* ACS Symposium Series 911. American Chemical Society, Washington, DC; **2005**, 611-635.

C. Jäckel, W. Seufert, S. Thust, B. Kokschi. Evaluation of the molecular interactions of fluorinated amino acids with native polypeptides. *ChemBioChem.* **2004**, *5*, 717-720.

### **Talks:**

“Fluorinated amino acids in native protein environments – screening for their preferred interaction partners”, seminar of the Graduiertenkolleg “Hydrogen bonding and hydrogen transfer”, Berlin / Germany, January, 11, **2006**.

“Evaluation of the molecular interactions of fluorinated amino acids with native polypeptides“, 230<sup>th</sup> ACS National Meeting, Washington / U.S.A., August, 28 – September, 1, **2005**.

“Development of new, highly potent HIV entry inhibitors“, 1<sup>st</sup> Trans-Departmental Workshop for Doctorate Students, Leipzig / Germany, November, 20 – 21, **2003**.

### **Poster presentations:**

“Evaluation of the potential of fluorinated amino acid side chains for peptide design and protein engineering“, C. Jäckel, M. Salwiczek, B. Kokschi, 7<sup>th</sup> German Peptide Symposium, Braunschweig / Germany, February, 27 - March, 2, **2005**.

“Evaluation of the potential of fluorinated amino acids for peptide and protein modification“, B. Kokschi, C. Jäckel, W. Seufert, S. Thust, 1<sup>st</sup> Leipzig Research Festival for Live Sciences, Leipzig / Germany, October, 18, **2002**.

## Danksagung

Frau Prof. Dr. Beate Koksche danke ich für die interessante und herausfordernde Themenstellung und die Betreuung der Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei ihr für die mir stets gewährte wissenschaftliche Freiheit und die Förderung meiner Arbeit durch Forschungs- und Vortragsreisen. Unserer Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Carlos Barbas III, Ph.D. und Herrn Prof. Dr. Wolfram Saenger danke ich herzlich für die Bereitstellung bester Bedingungen für meine molekularbiologischen Arbeiten in Ihren Labors während meines halbjährigen Forschungsaufenthaltes am TSRI in La Jolla und meiner Promotionszeit an der FU Berlin.

Mein Dank gilt des weiteren Herrn Prof. Dr. Hans-Jörg Hofmann, Dr. Robert Günther und Dr. Carsten Baldauf von der Universität Leipzig für die freundliche Unterstützung bei den durchgeführten Molekülmechanik- und Moleküldynamiksimulationen.

Für die sehr umfangreiche fachliche Unterstützung in den Bereichen der Aminosäure- und Peptidchemie sowie für viele wertvolle Diskussionen bedanke ich mich weiterhin bei Dr. Sven Thust.

Spezieller Dank gilt der Arbeitsgruppe von Prof. Carlos Barbas III, insbesondere Dr. Pilar Blancafort, Dr. Laurent Magnenat, Dr. Fujie Tanaka, Dr. Torbjörn Graslund und Roberta Fuller für ihre stete Diskussionsbereitschaft und konstruktive Unterstützung auf den Gebieten der Molekularbiologie und Biochemie. Vor allem aber danke ich ihnen für die sehr angenehme und fröhliche Arbeitsatmosphäre, die meinen Forschungsaufenthalt am TSRI zu einer unvergesslichen Zeit gemacht hat. Besonders möchte ich mich bei Acilino Freitas Vieira für die vielen intensiven Diskussionen und Anregungen zu Problemen des Phage Display-Projektes und die einmalige, freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke Mario Salwiczek, Wolfgang Seufert und Helgard Böttcher, die an diesem Forschungsprojekt mitgearbeitet haben.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gilt mein Dank für die Finanzierung dieser Arbeit. Dem PHD-Programm der Fakultät für Chemie und Mineralogie der Universität Leipzig danke ich besonders für die finanzielle Unterstützung während meines Forschungsaufenthaltes am TSRI in La Jolla.

Herzlich möchte ich mich bei Prof. John T. Welch für die Übernahme der Begutachtung meiner Dissertation bedanken.

Ich danke Godelind Wolf und Dr. Pamela Winchester für die sorgfältige Korrektur des Manuskriptes dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für die materielle Unterstützung sowie für Verständnis und Rückhalt während meines Studiums und der Promotion.

## Referat

Fluorierte Aminosäuren stellen wertvolle Werkzeuge für die Entwicklung Peptid-basierter Wirkstoffe dar. Neben ihrem Einsatz als NMR-Sonde können Fluoralkylgruppen eingebaut werden, um die Bioverfügbarkeit und die pharmakokinetischen Eigenschaften von Peptiden und Peptidmimetika zu verbessern. Desweiteren können diese nicht-natürlichen Bausteine für die strukturelle Stabilisierung von Proteinen und zur Steuerung deren Faltung und Oligomerisierung genutzt werden. Die Anwendbarkeit fluorierter Aminosäuren für das rationale Design von Peptid-Protein-Interaktionsdomänen ist bisher jedoch stark limitiert. Ursache dafür ist der Mangel an grundlegendem Wissen über die Wechselwirkungseigenschaften von Fluoralkylgruppen mit nativen Polypeptiden, wie z. Bsp. Größe, Polarität, Fluor-Fluor-Wechselwirkungen und deren Bedeutung für Faltung und Stabilität.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *coiled coil*-basiertes Modell-Polypeptid mit Substitutionspositionen für fluoralkyl-modifizierte Aminosäuren in spezifischen hydrophoben und polaren Wechselwirkungsdomänen etabliert, um die Wechselwirkungseigenschaften der Fluoralkylgruppen in Proteinumgebung systematisch zu studieren. Zur Charakterisierung dieser Eigenschaften wurden zwei Untersuchungsmethoden optimiert und angewendet. Das entwickelte *screening*-System war empfindlich genug um den Unterschied eines einzelnen Fluoratoms zwischen Aminosäure-Seitenketten zu detektieren. Aminosäuren mit systematisch variierten Seitenketten wurden mittels Festphasenpeptidsynthese in die Wechselwirkungsdomänen der Modell-Polypeptide eingebaut. Basierend auf Thermostabilitätsuntersuchungen der substituierten Peptide konnte gezeigt werden, dass eine Vergrößerung des Seitenkettenvolumens durch zunehmende Alkylfluorierung hydrophobe Protein-domänen stabilisiert. Eine Polarisierung von Alkylgruppen nahe der Fluorierungsstelle stört dagegen hydrophobe Wechselwirkungen. Selbstreplikations-Studien zeigten, dass Fluor-Fluor-Wechselwirkungen stark genug sind, um die Faltung von Peptiden und Proteinen zu beeinflussen. Desweiteren konnte mithilfe des *screening*-Systems gezeigt werden, dass C<sup>α,α</sup>-dialkylierte Aminosäuren die Strukturstabilität von *coiled coil*-basierten Peptidwirkstoffen erhöhen können. Um die bevorzugten Wechselwirkungspartner fluoralkyl-substituierter Aminosäuren zu ermitteln, wurde das Modell-Polypeptid für ein Phage-Display-basiertes Bibliotheks-*screening* verwendet. Größe und Diversität einer entsprechenden Peptidbibliothek wurden optimiert und die *coiled coil*-Bildung von *screening*- und Bibliothekspeptid konnte an der Oberfläche des löslichen Proteins MBP nachgewiesen werden. Der Einbau des Bibliothekspeptids in die Phagenhülle konnte ebenfalls realisiert werden. Da die *coiled coil*-Bildung an der Phagenoberfläche noch nicht verwirklicht werden konnte, wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Bibliotheks-*screenings* durchgeführt.



## Abstract

Fluorinated amino acids are powerful tools in the development of peptide-based drugs. Besides the use of organic fluorine as NMR label, fluoroalkyl groups can significantly improve structural and metabolic stability as well as the biological activity of peptides and peptidomimetics. Furthermore, such non-natural building blocks can be applied for the structural stabilization of proteins and for dictating their folding and oligomerization behavior. However, the applicability of fluorinated amino acids for the rational design of peptide-protein interaction sites is severely limited due to a lack of fundamental knowledge about the interaction properties of fluoroalkyl groups with native polypeptides, such as size, polarity, and the significance of fluororous interactions.

In this thesis, a *coiled coil*-based model polypeptide with substitution sites for fluoroalkyl-substituted amino acids within specific hydrophobic and polar interfaces was designed to systematically investigate the interaction properties of fluoroalkyl groups in protein environments. Screening methods for the evaluation of size and polarity as well as for the characterization of fluororous interactions have been established. This screening system was sensitive enough to detect differences of a single fluorine atom between amino acid side chains. Systematically altered amino acids that vary in side chain length and fluorine content were incorporated into both interfaces of the model polypeptides via solid phase peptide synthesis and their influence on stability of the folding motif was evaluated. Based on thermostability measurements of the substituted *coiled coils*, opposite steric and electronic consequences of alkyl-fluorination on hydrophobic protein interactions were described. While an increase in side chain volume upon stepwise fluorine substitution stabilizes hydrophobic protein cores, a polarization of alkyl moieties in proximity to the fluorination site disturbs hydrophobic interactions. *Coiled coil* self-replication studies revealed that fluororous interactions between substituted amino acids are strong enough to affect peptide and protein folding. Further investigations on C<sup>α,α</sup>-dialkylated amino acids that are known to increase the metabolic stability of peptides, suggested that these building blocks can also improve the structural stability of *coiled coil*-based drugs. To select the best native binding partners for fluoroalkyl-substituted amino acids, the designed model polypeptide was adapted for library screening by phage display. A *coiled coil*-based *stem loop* peptide library was constructed and optimized regarding its size and diversity. *Coiled coil* formation and covalent linkage of the screening peptide to the library peptide were demonstrated on the surface of the soluble protein MBP. The display of the *stem loop* peptide on phage coat could also be shown. Since the specific binding of the screening peptide to the library peptide could not yet be accomplished on phage surface, library screenings were not performed in this work.

## Abbreviations

**Å** angstrom, **ABNR** adopted basis Newton-Raphson, **ABTS** 2-2'-azino-di[3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid], **Ac** acetyl, **ACN** acetonitrile, **Aib**,  $\alpha$ -aminoisobutyric acid, **AIDS** acquired immuno-deficiency syndrome, **AP** alkaline phosphatase, **approx.** approximately, **APS** ammonium persulfate, **ATP** adenosine triphosphate,

---

**BOC** butyloxycarbonyl, **bp** base pairs, **BSA** bovine serum albumin, **Bz** benzyl, **BzISH** benzylmercaptan,

---

**CD** circular dichroism, **CPY** carboxypeptidase Y,

---

**DAST** (diethylamino)sulfur trifluoride, **DCM** dichloromethane, **DfeGly** (S)-4,4-difluoroethylglycine, **DfpGly** (S)-4,4-difluoropropylglycine, **DIC** N,N'-diisopropylcarbodiimide, **DIEA** N,N-diisopropylethylamine, **DMF** dimethylformamide, **DMSO** dimethylsulfoxide, **DNA** desoxyribonucleic acid, **dNTP** desoxynucleotide triphosphate mix, **DOPA** (S)-2-amino-3-(4,5-dihydroxy-2-phenyl)propionic acid, **dsDNA** double-stranded desoxyribonucleic acid, **DTT** 1,4-dithio-DL-threitol,

---

**E<sub>x</sub>** electrophilic peptide fragment X, **E. coli** *Escherichia Coli*, **EDT** 1,2-ethanedithiol, **EDTA** ethylenediaminetetraacetic acid, **EGly** (S)-ethylglycine, **EK<sub>L</sub>** enterokinase light chain, **ELISA** enzyme-linked immuno-sorbent assay,

---

**Flp** 4(S)-fluoroproline, **Fip** 4(R)-fluoroproline, **fMLF** for-Met-Leu-Phe-NH<sub>2</sub>, **Fmoc** 9-fluorenylmethoxycarbonyl, **FRET** fluorescence resonance energy transfer,

---

**GdnHCL** guanidine hydrochloride,

---

**HATU** 2-(7-aza-1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate, **HBTU** 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate, **HIV** human immuno-deficiency virus, **HOAt** 1-hydroxy-7-azabenzotriazole, **HOBt** 1-hydroxy-benzotriazole, **HPLC** high performance liquid chromatography, **HRP** horseradish peroxidase, **Hyp** 4(R)-hydroxyproline,

---

**IPTG** isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside,

---

**kbp** kilobase pairs,

---

**LB** luria broth,

---

**MALDI-ToF-MS** matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, **MBP** maltose binding protein, **MeLeu**  $\alpha$ -methylleucine, **MMP** matrix metalloproteinase, **MOPS** 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid,

---

**N** nucleophilic peptide fragment, **NCA** N-carboxy anhydride, **NMM** N-methylmorpholine, **NMP** N-methyl-2-pyrrolidon, **NMR** nuclear magnetic resonance, **OD** optical density,

---

**OGp** 4-guanidinophenyl, **Otf** triflate,

---

**P<sub>x</sub>** ligation product X, **PAGE** polyacrylamide gelelectrophoresis, **Pbf** 2,2,4,6,7-penta-methyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl, **PBS** phosphate-buffered saline, **PCR** polymerase chain reaction, **PDB** protein data bank, **PEG** poly(ethylene glycol), **PET** positron emission tomography, **PMR** partially modified retro, **PNPP** para-nitrophenyl phosphate, **PS** packaging signal, **PyBOP** benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate, **PVDF** polyvinylidene difluoride,

---

**RF** parental replicative form, **RNA** ribonucleic acid, **RT** room temperature,

---

**SB** super broth, **SD** steepest descent, **SDS** sodium dodecyl sulfate, **SPPS** solid phase peptide synthesis, **SPR** surface plasmon resonance, **ssDNA** single-stranded desoxyribonucleic acid,

---

**TBS** tris-buffered saline, **TBTU** 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium tetrafluoroborate, **<sup>t</sup>Bu** *tert*-butyl, **TCEP** tris(2-carboxy)ethylphosphine, **TCTU** 2-(6-Chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium tetrafluoroborate, **TEMED** N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, **TET** 2,2,2-trifluoroethanethiol, **TFA** trifluoroacetic acid, **THF** tetrahydrofuran, **TfeGly** (S)-4,4,4-trifluoroethylglycine, **Tfm** trifluoromethyl, **TfmAla** 3,3,3-trifluoromethylalanine, **Tfv** 4,4,4-trifluorovaline, **TIS** triisopropyl silane, **TPCK** N-*p*-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone, **TRH** thyrotropin-releasing hormone, **Trx** thioredoxin, **tRNA** transfer ribonucleic acid, **Trt** trityl, **TS** thioglycolic acid,

---

**UV** ultraviolet,

---

**Z** benzyloxycarbonyl.

## Table of contents

<b>1</b>	<b>Introduction</b> .....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
<b>2</b>	<b>Fluorine in Bioactive Molecules – The Way from Medicinal Chemistry to Peptide Design and Protein Engineering</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>The Properties of Organic Fluorine</b> .....	<b>4</b>
2.1.1	Fluorine’s Capability to Participate in Hydrogen Bonds .....	4
2.1.2	The Steric Demand of Fluorocarbon Groups .....	8
2.1.3	The Unique Electronic Properties of Organic Fluorine .....	11
<b>2.2</b>	<b>The Advanced Role of Fluorine in Medicinal Chemistry</b> .....	<b>13</b>
2.2.1	Fluorine Substitution as a Tool in Drug Research .....	13
2.2.2	Fluorine in Medical Diagnostics – Raman Spectroscopy .....	15
2.2.3	Fluorine in Medical Diagnostics – <sup>18</sup> F Positron Emission Tomography .....	15
<b>2.3</b>	<b>Fluorine’s Benefit in Peptide and Protein Chemistry</b> .....	<b>16</b>
2.3.1	Fluorine as a Tool in Protein Analysis – <sup>19</sup> F NMR Spectroscopy .....	16
2.3.1.1	Applications of <sup>19</sup> F NMR .....	16
2.3.1.2	Incorporation of <sup>19</sup> F NMR-Labels into Proteins .....	17
2.3.2	Fluorinated Building Blocks as Modulators of Biological Activity and Stability of Peptides .....	19
2.3.2.1	Fluorinated Amide Bond Isosters.....	19
2.3.2.2	Amino Acids with Fluorinated Side Chains .....	21
2.3.3	The Impact of Fluorine on Structural Stability and the Folding of Proteins .....	25
2.3.3.1	The Stabilization of Collagen with Fluoroproline Residues.....	25
2.3.3.2	The Stabilization of Hydrophobic Protein Cores by Perfluorination .....	26
<b>3</b>	<b>Aim of the Work</b> .....	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>Concepts of a Peptide-Based Screening System</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Fluorine-Containing Amino Acids as Peptide Building Blocks</b> .....	<b>32</b>
4.1.1	Synthesis of Fluorine-Containing Amino Acids .....	32
4.1.1.1	Side Chain-Modified Amino Acids .....	32

4.1.1.2	C <sup>α,α</sup> -Dialkylated Amino Acids .....	34
4.1.1.3	Enzymatic Resolution of Racemic Fluorinated Amino Acids .....	34
4.1.2	Incorporation of Fluorine-Containing Amino Acids into Peptides .....	36
4.1.2.1	Side Chain-Modified Amino Acids .....	36
4.1.2.2	C <sup>α,α</sup> -Dialkylated Amino Acids .....	37
<b>4.2</b>	<b>Structural Requirements for a Peptide-Based Screening System .....</b>	<b>40</b>
<b>4.3</b>	<b>The <i>α</i>-Helical <i>Coiled Coil</i> Folding Motif .....</b>	<b>41</b>
4.3.1	Structure and Design Principles of the Folding Motif .....	41
4.3.2	Self-Replication Properties of <i>Coiled Coil</i> Peptides .....	43
<b>4.4</b>	<b>Phage Display Technology .....</b>	<b>45</b>
4.4.1	The Filamentous Phage M13 .....	46
4.4.1.1	Structure and Genome of Bacteriophage M13 .....	46
4.4.1.2	Infection and Reproduction of Bacteriophage M13 .....	48
4.4.2	Display of Peptides and Proteins on Phage Particles .....	50
4.4.2.1	General Strategies for Phage Display .....	50
4.4.2.2	Phagemid Display on Minor Coat Protein pIII .....	52
<b>5</b>	<b>Development and Implementation of the Screening System .....</b>	<b>54</b>
<b>5.1</b>	<b>The <i>Coiled Coil</i>-Based Screening System .....</b>	<b>54</b>
5.1.1	<i>Coiled Coil</i> Design for the Evaluation of the Interaction Properties .....	54
5.1.2	<i>Coiled Coil</i> Design for the Selection of Preferred Interaction Partners .....	58
<b>5.2</b>	<b>Investigations on the Interaction Properties of Fluorinated Amino Acids</b>	<b>61</b>
5.2.1	The Optimization of the Screening Methods .....	62
5.2.1.1	The Optimization of Thermal Denaturation Experiments .....	62
5.2.1.2	The Optimization of Self-Replication Experiments .....	65
5.2.2	Proof of Concept .....	68
5.2.2.1	The Lys8-Glu29 Salt Bridge Formation .....	68
5.2.2.2	The Sensitivity of the Screening Methods .....	71
5.2.3	Investigations on Side Chain-Fluorinated Amino Acids .....	77
5.2.3.1	Interaction Properties in a Hydrophobic Protein Environment .....	78
5.2.3.2	Interaction Properties in a Polar Protein Environment .....	82

5.2.4	Investigations on Fluoroalkyl-substituted, C <sup>α,α</sup> -Dialkylated Amino Acids.....	85
5.2.4.1	Interaction Properties in a Hydrophobic Protein Environment.....	86
5.2.4.2	Interaction Properties in a Polar Protein Environment.....	89
<b>5.3</b>	<b>Selection of Preferred Interaction Partners for Fluorinated Amino Acids by Phage Display.....</b>	<b>92</b>
5.3.1	Cloning of the <i>Stem Loop</i> Peptide.....	92
5.3.2	Construction of the <i>Stem Loop</i> Library.....	94
5.3.3	Verification of the Library Screening Strategy.....	97
5.3.4	Optimization of the Phage Display System.....	101
5.3.4.1	Optimization of the <i>Coiled Coil</i> Binding on Phage Surface.....	101
5.3.4.2	Redesign of the <i>Stem Loop</i> Protein Fragment.....	106
5.3.4.3	Evaluation of <i>Coiled Coil</i> Formation and Native Ligation on MBP.....	110
5.3.4.4	Evaluation of the Display of the <i>Stem Loop</i> Protein on Phage Coat.....	112
5.3.4.5	Display of the MBP- <i>Stem Loop</i> Fusion Protein on Phage Surface.....	114
5.3.4.6	Investigation of the <i>Coiled Coil</i> Formation without Native Ligation.....	117
5.3.4.7	Display of the <i>Stem Loop</i> on Phage Surface with an N-Terminal Tag.....	120
<b>6</b>	<b>Summary and Outlook.....</b>	<b>127</b>
<b>7</b>	<b>Experimental Procedures and Methods.....</b>	<b>130</b>
<b>7.1</b>	<b>Peptide Chemistry, Thermostability, and Self-Replication Experiments</b>	<b>130</b>
7.1.1	General Procedures and Devices.....	130
7.1.2	Peptide Synthesis.....	133
7.1.2.1	Coupling of the First Amino Acid to the Solid Support.....	133
7.1.2.2	Peptide Chain Elongation.....	135
7.1.2.3	Deprotection and Cleavage from Solid Support.....	137
7.1.2.4	Analysis and Purification.....	138
7.1.2.5	Detailed Description of Peptide Syntheses.....	139
7.1.3	Investigations on Thermal Stability of <i>Coiled Coil</i> Peptides.....	150
7.1.3.1	Ligation of the <i>Coiled Coil</i> Fragments.....	150
7.1.3.2	Thermal Stability Measurements.....	151
7.1.4	Self-Replication Experiments.....	152

<b>7.2</b>	<b>Molecular Modeling.....</b>	<b>153</b>
<b>7.3</b>	<b>Molecular Biology and Phage Display .....</b>	<b>155</b>
7.3.1	Declaration of Suppliers .....	155
7.3.2	Recipes .....	157
7.3.3	General Techniques .....	160
7.3.3.1	Plasmid DNA Isolation from Cell Cultures .....	161
7.3.3.2	DNA Preparation and Purification.....	162
7.3.3.3	PCR-Colony Scan and DNA Sequencing .....	163
7.3.4	Preparation of Electrocompetent Cells.....	164
7.3.5	Molecular Cloning.....	165
7.3.5.1	Construction of <i>Stem Loop</i> -Encoding DNA Fragments .....	165
7.3.5.2	<i>Sfi</i> I Digest of PCR Products.....	171
7.3.5.3	Ligation of <i>Stem Loop</i> DNA into Vectors and Transfection of <i>E. coli</i> .....	172
7.3.6	Library Construction and Optimization .....	172
7.3.6.1	Evaluation of Background and Diversity .....	173
7.3.6.2	Optimization of Library Size.....	173
7.3.7	Preparation of Helper Phage.....	175
7.3.8	Phage and Protein Production .....	176
7.3.8.1	Preparation of pIII and MBP Fusion Proteins .....	176
7.3.8.2	Production of Recombinant Phage .....	176
7.3.8.3	Preparation of Recombinant Phage.....	179
7.3.9	Evaluation of the Display of Recombinant pIII on Phage Coat.....	179
7.3.9.1	Detection of <i>Stem Loop</i> -Cys Residues on (t)- and (nt)-phage.....	179
7.3.9.2	SDS-PAGE and Western Blotting of (nt)-Phage.....	181
7.3.9.3	Detection of MBP- <i>Stem Loop</i> Fusion Proteins on (ft)-Phage .....	182
7.3.9.4	Detection of the FLAG tag on (et)-Phage .....	183
7.3.10	<i>Stem Loop</i> - Target Binding Assays.....	184
7.3.10.1	Evaluation of <i>Coiled Coil</i> formation using <i>ELISA</i> Binding Tests .....	184
7.3.10.2	Evaluation of <i>Coiled Coil</i> Formation using Magnetic Particles .....	187
7.3.10.3	Phage Binding during Selection Rounds .....	188
<b>8</b>	<b>Literature .....</b>	<b>189</b>