

# Entwicklung eines Protein-Kopplungsverfahrens basierend auf WW-Domänen

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Christoph Parthier

geboren am 29. Mai 1973 in Halle

Gutachter:   1. Prof. Dr. R. Rudolph, Institut für Biotechnologie, Universität Halle  
              2. Prof. Dr. A. Beck-Sickinger, Institut für Biochemie der Universität Leipzig  
              3. Prof. Dr. J. Balbach, Institut für Biophysik, Universität Halle

verteidigt am: 02. März 2005

**urn:nbn:de:gbv:3-00008083**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-00008083>]



# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>4</b>
<b>I.1.</b>	<b>Verfahren zur artifiziellen Proteinassoziation</b> .....	<b>4</b>
I.1.1.	Chemische Konjugation von Proteinen ( <i>crosslinking</i> ) .....	5
I.1.2.	Gerichtete Assoziation und Kopplung von Proteinen .....	6
<b>I.2.</b>	<b>WW-Domänen</b> .....	<b>12</b>
I.2.1.	Struktur und Funktion von WW-Domänen .....	12
I.2.2.	Spezifische Bindungsmotive der WW-Domänen .....	14
I.2.3.	Biologische Bedeutung von WW-Domänen .....	16
I.2.4.	Das Formin-bindende Protein 11 (FBP11) .....	18
<b>I.3.</b>	<b>Ziel der Arbeit</b> .....	<b>21</b>
<b>II.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
<b>II.1.</b>	<b>Geräte und Zubehör</b> .....	<b>22</b>
II.2.	Chemikalien, Enzyme, Kits .....	23
II.3.	Bakterienstämme .....	24
II.4.	Plasmide .....	24
II.5.	Oligonukleotide.....	24
II.6.	Lösliche Peptide.....	25
II.7.	Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen .....	26
II.8.	Nährmedien für die Kultivierung von <i>E.coli</i> .....	27
II.9.	Molekularbiologische Methoden .....	28
II.9.1.	Isolierung und Aufreinigung von DNA aus <i>E.coli</i> .....	28
II.9.2.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	28
II.9.3.	Ortsgerichtete Mutagenese .....	28
II.9.4.	DNA-Sequenzierung.....	28
II.9.5.	Generierung der GST-WW-Fusionskonstrukte .....	29
II.9.6.	Klonierung der Polyprolin-GFP-Fusionsproteine.....	30
<b>II.10.</b>	<b>Proteintechnologische Methoden</b> .....	<b>32</b>
II.10.1.	Kultivierung von <i>E.coli</i> und rekombinante Proteinexpression .....	32
II.10.2.	Kultivierung von <i>E.coli</i> zur Expression <sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C-markierter Proteine.....	32
II.10.3.	Zellernte, -aufschluß und Gewinnung des löslichen Proteinanteils .....	32
II.10.4.	Glutathion-Affinitätschromatografie .....	32
II.10.5.	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC) .....	33
II.10.6.	Proteolytische Spaltung von Fusionsproteinen durch Thrombin .....	33
II.10.7.	Analytische und präparative <i>Reversed-Phase</i> -HPLC .....	33
II.10.8.	Analytische und präparative Gelfiltrationschromatografie.....	34
II.10.9.	Lyophilisation .....	35
II.10.10.	Konzentrierung von Proteinlösungen .....	35
II.10.11.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	35
<b>II.11.</b>	<b>Peptidchemische Methoden &amp; Spot-Membran-Techniken</b> .....	<b>36</b>
II.11.1.	Festphasensynthese und Reinigung löslicher Peptide .....	36
II.11.2.	Herstellung membrangebundener Peptidbibliotheken ( <i>Spot</i> -Synthese) .....	36
II.11.3.	N-terminale Biotinylierung der WW-Domäne .....	39
II.11.4.	Bindungsanalysen unter Verwendung membrangebundener Peptidbibliotheken .....	40
<b>II.12.</b>	<b>Biophysikalische Methoden &amp; Strukturaufklärung</b> .....	<b>41</b>
II.12.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV/VIS-Spektroskopie.....	41
II.12.2.	Bindungsanalysen mittels Fluoreszenzspektroskopie (Fluoreszenztitration).....	42
II.12.3.	Bestimmung der Dissoziationskonstante durch Bindungskompetition .....	43

II.12.4.	Bestimmung der thermodynamischen Bindungsparameter (van't Hoff-Analyse) .....	44
II.12.5.	pH-Titration der Ligandenbindung .....	44
II.12.6.	Bestimmung des Redoxpotentials und der freien Energie .....	44
II.12.7.	Chemisch induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge .....	45
II.12.8.	Analyse thermisch induzierter Entfaltungsübergänge.....	46
II.12.9.	Differential Scanning-Kalorimetrie (DSC) .....	47
II.12.10.	Massenspektrometrie .....	47
II.12.11.	Strukturmodellierung und -visualisierung .....	47
II.12.12.	Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) .....	48
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
<b>III.1.</b>	<b>Charakterisierung der WW-Domäne FBP11-WW1 .....</b>	<b>51</b>
III.1.1.	Wildtyp-Varianten von FBP11-WW1: WW-AKSM und WW- $\Delta$ kt.....	51
III.1.2.	Herstellung der isolierten WW-Domäne .....	51
III.1.2.1.	Expression und Reinigung der GST-WW-Fusionsproteine .....	52
III.1.2.2.	Gewinnung der isolierten WW-Domäne .....	53
III.1.3.	Spektroskopische Eigenschaften.....	54
III.1.3.1.	Fluoreszenz .....	54
III.1.3.2.	Circulardichroismus .....	55
III.1.3.3.	$^1\text{H-NMR}$ .....	57
III.1.4.	Stabilität der isolierten WW-Domäne .....	58
III.1.4.1.	Stabilität gegenüber Guanidinhydrochlorid.....	58
III.1.4.2.	Thermische Stabilität.....	60
III.1.5.	Bindung prolinreicher Liganden.....	63
III.1.5.1.	Sekundärstruktur prolinreicher Liganden .....	63
III.1.5.2.	Affinität von FBP11-WW1 zu prolinreichen Liganden.....	64
III.1.5.3.	pH-Abhängigkeit der Dissoziationskonstante .....	66
III.1.5.4.	Temperaturabhängigkeit und Bestimmung der thermodynamischen Parameter.....	67
III.1.5.5.	Abhängigkeit von der Salzkonzentration.....	69
III.1.5.6.	Bindungsstudien unter Verwendung Cellulose-Membran-gebundener Peptidbibliotheken (Spot-Technologie): Etablierung der Bindungsanalytik .....	70
III.1.5.7.	Analyse der Bindung von FBP11-WW1 an Varianten prolinreicher Liganden .....	72
<b>III.2.</b>	<b>Strukturaufklärung von FBP11-WW1 .....</b>	<b>75</b>
III.2.1.	Herstellung und Reinigung von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierter WW-Domäne .....	75
III.2.2.	Aufnahme der NMR-Spektren und Zuordnung der Resonanzfrequenzen.....	76
III.2.3.	Struktur der isolierten WW-Domäne (ohne Ligand) .....	76
III.2.4.	Analyse der Ligandenbindung mittels NMR.....	78
III.2.5.	Struktur von FBP11-WW1 im Komplex mit einem prolinreichen Liganden .....	80
III.2.6.	Struktureller Vergleich der WW-Domäne im freien Zustand mit dem Komplex .....	83
<b>III.3.</b>	<b>Etablierung des kovalenten Kopplungssystems.....</b>	<b>85</b>
III.3.1.	Überblick .....	85
III.3.2.	Cystein-Varianten der WW-Domäne .....	85
III.3.2.1.	Modellierung und Mutagenese von WW-D24C und WW-K35C .....	86
III.3.2.2.	Charakterisierung der Cystein-Varianten .....	87
III.3.3.	Cystein-Varianten des Polyprolin-Liganden.....	90
III.3.4.	Kovalente Kopplung von WW-Domäne und prolinreichem Ligand.....	93
III.3.4.1.	Versuche zur Verbrückung auf Peptid-Spot-Membranen.....	93
III.3.4.2.	Verbrückung in Lösung - Etablierung der HPLC-Analytik .....	94
III.3.4.3.	Analyse der Stabilisierung des disulfidverbrückten Komplexes .....	95
III.3.4.4.	Spezifität der Stabilisierung.....	98
III.3.4.5.	Das Redoxpotential der WW-Polyprolin-Disulfidbrücke .....	100

III.3.4.6.	Disulfidverbrückung des Komplexes durch Oxidation in Gegenwart von Luftsauerstoff.....	105
III.3.4.7.	<sup>1</sup> H-NMR-Analyse ausgewählter kovalenter Komplexe von WW-Domäne und Ligand .....	108
III.3.5.	Kovalente Assoziation von GST-WW und PP-GFP .....	110
III.3.5.1.	Herstellung der GST- und GFP-Fusionsproteine .....	111
III.3.5.2.	Bindungseigenschaften von GST-WW-K35C.....	112
III.3.5.3.	Nachweis der kovalenten Assoziation von GST und GFP .....	113
III.3.5.4.	Spezifität der Assoziation .....	119
III.3.5.5.	Thermische Stabilität des GST-GFP-Komplexes.....	120
<b>IV.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>122</b>
<b>IV.1.</b>	<b>Stabilität, Funktion und Struktur von FBP11-WW1.....</b>	<b>122</b>
IV.1.1.	Stabilität der FBP11-WW1-Varianten .....	122
IV.1.2.	Biochemische Charakterisierung der PPLP(P)-Bindung .....	124
IV.1.3.	Strukturelle Basis der PPLP(P)-Bindung durch FBP11-WW1 .....	126
<b>IV.2.</b>	<b>Kovalent stabilisierte Assoziation vermittelt durch WW-Domänen.....</b>	<b>130</b>
IV.2.1.	FBP11-WW1 und prolinreiche Sequenzen als Heterodimerisierungsmotiv .....	130
IV.2.2.	Strukturelle Aspekte der artifiziellen Disulfidbrücke.....	132
IV.2.3.	Einfluß des Oxidationsverfahrens auf Effizienz und Spezifität der Kopplung .....	135
IV.2.4.	FBP11-WW1/Polyprolin im Vergleich mit anderen Assoziationsverfahren.....	140
IV.2.5.	Szenario einer Anwendung: Modulares Vektorsystem basierend auf VP1 .....	143
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>148</b>
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>150</b>
<b>VII.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>169</b>
VII.1.	Übersicht der experimentell bestimmten Molekularmassen .....	169
VII.2.	Dissoziationskonstanten bestimmt für WW-AKSM mit PPN1/PPN2.....	170
VII.3.	NMR-Strukturstatistik.....	171
VII.4.	Atomnomenklatur ausgewählter Aminosäuren.....	172
VII.5.	RP-HPLC-Retentionszeiten der Kopplungsspezies .....	173
VII.6.	Verwendete Abkürzungen und englische Fachbegriffe .....	174

# I. Einleitung

Eine der bedeutendsten Implikationen der dreidimensionalen Struktur von Proteinen besteht in ihrer Fähigkeit zur gegenseitigen Wechselwirkung in Form einer spezifischen Bindung. Diese gerichtete Assoziation von Peptid- und Proteinmolekülen kann von transienter oder dauerhafter Natur sein und wird durch die individuellen biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften der Interaktionspartner vermittelt. Protein-Protein-Interaktionen sind in nahezu jeden Lebensprozeß involviert, ermöglicht durch die große Vielfalt und Variabilität dieser Wechselwirkungen. Im Zeitalter der Verfügbarkeit vollständiger Genomsequenzen zahlreicher Organismen, darunter auch der des Menschen, steht die Untersuchung dieser Vorgänge auf Proteinebene im Mittelpunkt der biochemischen Grundlagenforschung. Eine wesentliche Herausforderung besteht dabei in der Analyse des Netzwerkes von Protein-Protein-Wechselwirkungen, das die Komplexität und funktionelle Diversität biologischer Systeme widerspiegelt.

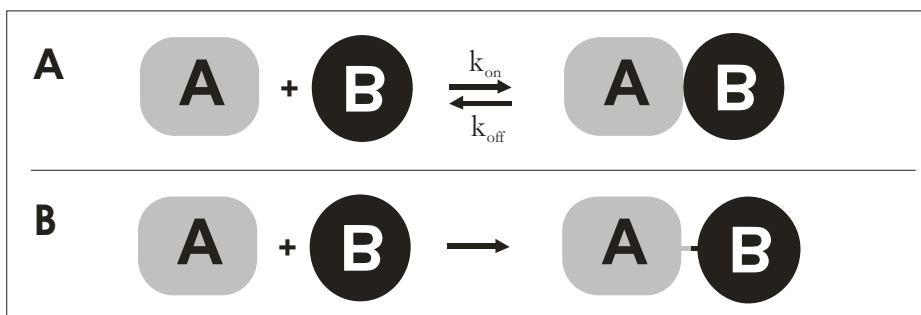
Die Kenntnis der molekularen Details, die diesen Interaktionen zugrunde liegen, bildet die Voraussetzung für neuartige Ansätze, in denen z.B. die natürlichen Bindungseigenschaften von Proteinen biotechnologisch nutzbar gemacht werden. Die vorliegende Arbeit beschreibt einen derartigen Ansatz anhand der Etablierung eines Verfahrens zur gerichteten Assoziation und Kopplung von Proteinen, unter Nutzung der natürlichen Affinität von WW-Domänen zu prolinreichen Aminosäuresequenzen.

## I.1. Verfahren zur artifiziellen Proteinassoziation

Unter artifizieller Proteinassoziation kann die künstlich induzierte Verbindung von mindestens zwei Proteinen verstanden werden, deren individuelle Funktionen im gemeinsamen Komplex kombiniert werden, wodurch ein bifunktionelles Produkt (Heterodimer) entsteht.

Die zufällige, nicht-kovalente Assoziation von Proteinen, die *per se* keine Affinität zueinander aufweisen, wird vorwiegend durch Diffusionsprozesse bestimmt und führt üblicherweise zu einer schnellen Dissoziation des entstandenen Komplexes. Die Lage des Gleichgewichtes von Assoziation und Dissoziation kann durch das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten beider Teilprozesse ( $k_{on}$  bzw.  $k_{off}$ ) ausgedrückt werden (Abbildung 1 A).

Wird der gebildete Komplex jedoch durch Ausbildung einer intermolekularen, kovalenten Bindung stabilisiert, so wird die Möglichkeit einer Dissoziation aufgehoben ( $k_{off} = 0$ ). Die Reaktion unterliegt dann nicht mehr der ursprünglichen Gleichgewichtseinstellung, sondern führt ausschließlich zur Ausbildung des kovalenten Assoziates (Abbildung 1 B).



**Abbildung 1:** Assoziation von zwei Proteinen (A und B) **(A)** Das Gleichgewicht von Assoziation und Dissoziation der Komponenten beruht auf der nicht-kovalente Wechselwirkung beider Komponenten. **(B)** Stabilisierung des Heterodimers von A und B durch eine kovalente Wechselwirkung (Verhinderung der Dissoziation).

### 1.1.1. Chemische Konjugation von Proteinen (*crosslinking*)

Die chemische Kopplung von Proteinen durch quervernetzende Substanzen (auch *Crosslinker* genannt) stellt eine klassische Methode zur kovalenten Verknüpfung von Proteinen dar. Die auf diese Weise hergestellten Proteinkonjugate finden seit geraumer Zeit Anwendung in Gebieten von Medizin und Forschung. Ein klassisches Beispiel stellt die Konjugation von Antikörpern oder anderen Bindemolekülen (Avidin/Streptavidin) mit Enzymen wie Peroxidase, Alkalische Phosphatase, Glucoseoxidase oder  $\beta$ -Galactosidase dar, die sowohl für die *in vitro*- und *in vivo*-Diagnostik als auch in der biochemischen Grundlagenforschung eine bedeutende Rolle spielen (Porstmann et al., 1985; Hermanson, 1996). Aber auch für therapeutische Anwendungen sind bifunktionelle Proteine von Interesse, wie die Entwicklung bispezifischer Antikörper sowie tumor-adressierter Antikörper-Toxin-Konjugate (Immuntoxine) für die Krebstherapie zeigt (Holliger & Winter, 1993; Pastan & Kreitman, 2002). Vor der Verfügbarkeit dieser Systeme in Form von rekombinanten Fusionsproteinen, stellte die chemische Kopplung der einzelnen Komponenten die wichtigste Methode bei der Generierung dieser oligomeren Proteinkonjugate dar (Karpovsky et al., 1984; Stevenson et al., 1989; Pastan & Fitzgerald, 1989).

Für die Konjugation von Proteinen werden verschiedene reaktive Verbindungen verwendet, die eine einfache Kopplung über spezifische funktionelle Gruppen der Proteine unter relativ milden Bedingungen ermöglichen (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Übersicht einer Auswahl von Methoden zur chemischen Kopplung (*Crosslinking*) von Proteinen und Beispiele ihrer Anwendung Hermanson, 1996.

Prinzip	Crosslink-Reagenz	Beispiel
<b>homobifunktionell</b>		
Thioether-Bindung	Diiodacetamid, Dimaleimid	bispezifische Antikörper (Stevenson et al., 1989)
Disulfidbrücke	Pyridyldisulfide (DTP)	Konjugation EGF-Ricin A (Cawley et al., 1980)
	Thiosulfate	hPL-Antigen/Diphtheriatoxin-Konjugat (Chang & Neville, Jr., 1977)
	Dithionitrobenzoat (DTNB)	bispezifische Antikörper (Brennan et al., 1985)
Schiffsche Base	Glutaraldehyd, Periodat	Stabilisierung v. Fv-Antikörperfragmenten (Glockshuber et al., 1990)
		Antikörper-Enzym-Konjugate (Boorsma & Streefkerk, 1979)
Amid-Bindung	Disuccinimidester, Diimidoester, Diisocyanat	Antikörper-Enzym-Konjugate (Philpott et al., 1973)
<b>heterobifunktionell</b>		
Thioether-Bindung	Succinimidyl-Maleimid (SMCC)	Antikörper-Glucoseoxidase-Konjugat (Yoshitake et al., 1979)
	Succinimidyl-Iodacetamid	Enzym-Konjugate (Baumert & Fasold, 1989)
Disulfidbrücke	Succinimidyl-Pyridyldisulfid (SPDP)	Antikörper-POD-Konjugat (Carlsson et al., 1978)
Amid-Bindung	Carbodiimid (EDC + Sulfo-NHS)	Concanavalin-A-Diphtheria-Toxin-Konjugat (Gilliland et al., 1978)

Die gebräuchlichsten Verfahren beruhen auf der Reaktivität von primären Amino-, Thiol-, Hydroxyl- oder Carboxylgruppen bestimmter Aminosäuren. Dabei lassen sich homo- und bifunktionelle Reagenzien zur Quervernetzung (*Crosslinking*) von Proteinen unterscheiden. Während homobifunktionelle *Crosslinker* insbesondere für intramolekulare Quervernetzungen prädestiniert sind, erlauben heterobifunktionelle Verbindungen, aufgrund ihrer Reaktivität gegenüber zwei verschiedenen funktionellen Gruppen, eine gezieltere Konjugation von unterschiedlichen Proteinen. Dennoch ist die Spezifität dieser chemischen Kopplungsreaktion im Vergleich zu gerichteten Verfahren (Abschnitt I.1.2) gering, da sie im Wesentlichen von der Anzahl der zugänglichen funktionellen Gruppen des Proteins abhängt, mit denen der *Crosslinker* reagieren kann.

Aufgrund der Abundanz von primären Aminogruppen in Proteinen führt der Einsatz entsprechender *Crosslink*-Reagenzien häufig zu hochmolekularen Spezies der zu koppelnden Komponenten und ist für eine Heterodimerisierung zumeist ungeeignet.

Die in Proteinen wesentlich selteneren Thiolgruppen stellen dagegen oftmals besser geeignete Verknüpfungspunkte dar und lassen sich mit thiolreaktiven *Crosslinkern* für eine Konjugation einsetzen, sofern die jeweiligen Cysteine nicht in intramolekulare Disulfidbrücken involviert oder anderweitig essentiell für die Funktion des Proteins sind. Chemische und molekularbiologische Methoden erlauben zwar die Einführung (und Entfernung) von Thiolgruppen an die Oberfläche von Proteinen, allerdings können diese Modifikationen die Proteineigenschaften durch unspezifische Nebenreaktionen (z.B. Oxidation, Aggregation) auch negativ beeinflussen und sind dementsprechend für jede Anwendung individuell zu optimieren (Hermanson, 1996).

Bei Vorhandensein mehrerer zugänglicher Thiolgruppen innerhalb eines Proteinmoleküls gestaltet sich die Anwendung dieser *Crosslinker* allerdings problematisch, z.B. im Hinblick auf eine kontrollierte Heterodimerisierung der Komponenten. Lediglich Verfahren zur gerichteten Assoziation von Proteinen können in diesen Fällen die Entstehung unerwünschter, höhermolekularer Spezies vermeiden (Abschnitt I.1.2)

Eine gewisse Besonderheit bei der chemischen Konjugation von Proteinen stellen Verfahren dar, die auf der Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den Kopplungspartnern beruhen (Tabelle 1). Im Gegensatz zu anderen Methoden ist diese Form der Bindung von reversiblen Charakter, da die Gegenwart von thiolhaltigen Substanzen (z.B. DTT, GSH,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Cystein) zu einer Reduktion des Disulfides bzw. zu einer Thiol-Disulfid-Austauschreaktion führen kann, was im Fall des Proteinkonjugates mit einer Dissoziation verbunden ist.

Dagegen stehen natürliche intra- und intermolekulare Disulfidbrücken von Proteinen im Allgemeinen unter dem Einfluß einer definierten strukturellen Umgebung, wodurch die Stabilität der Bindung gegenüber Reduktionsmitteln signifikant verändert sein kann (Creighton, 1984).

Für die Entwicklung neuer Verfahren zur stabilen Assoziation von Proteinen auf der Grundlage von Disulfidbrücken hat dieser Aspekt eine wesentliche Bedeutung, da die Wahrscheinlichkeit ihrer Ausbildung auf analoge Weise durch strukturelle Parameter der jeweiligen Umgebung bestimmt wird.

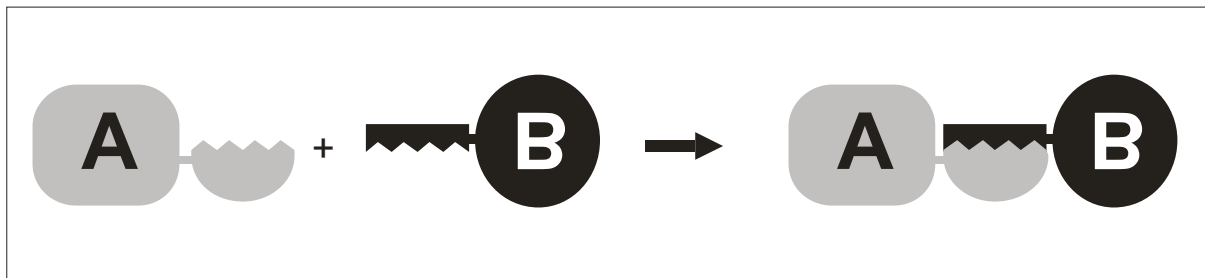
### **I.1.2. Gerichtete Assoziation und Kopplung von Proteinen**

Im Unterschied zur chemischen Konjugation von Proteinen, deren Spezifität lediglich auf der Reaktivität bestimmter funktioneller Gruppen beruht, macht man sich in gerichteten Verfahren zur Proteinassoziation die gegenseitige Affinität der zu verbindenden Komponenten zu nutze. Dabei kann entweder eine den Kopplungspartnern inhärente, natürliche Affinität verwendet werden, oder mittels genetischer Fusion von geeigneten Dimerisierungs- bzw.



Oligomerisierungsmotiven artifizelle Bindungseigenschaften in die zu assoziierenden Proteine eingebracht werden. Vermittelt durch die Affinität dieser Bindemodule kann eine gerichtete Assoziation von gleichartigen (Homooligomere) oder verschiedenen Proteinmolekülen (Heterooligomere) bewerkstelligt werden (Abbildung 2).

Die Stabilisierung eines heterodimeren Proteinkomplexes beruht auf der Beeinflussung der Geschwindigkeitskonstanten von Assoziation ( $k_{on}$ ) und Dissoziation ( $k_{off}$ ) beider Komponenten, bedingt durch die Bindungseigenschaften des eingeführten Heterodimerisierungsmotives (hauptsächlich Herabsetzung von  $k_{off}$ , vgl. Abbildung 1 A).



**Abbildung 2:** Prinzip der gerichteten Assoziation von zwei Proteinen (A und B) vermittelt durch ein fusioniertes Heterodimerisierungsmotiv. Die Größenverhältnisse von Protein und Heterodimerisierungsmotiv können sehr unterschiedlich sein und wurden in dieser Darstellung vernachlässigt.

Obwohl die Methoden der modernen Gen- und Biotechnologie heutzutage eine effiziente Herstellung von rekombinanten Fusionsproteinen ermöglichen, erweist sich die Herstellung von größeren Proteinchimären oftmals als problematisch. So sinkt bei der Expression in *E.coli* die Ausbeute an rekombinantem Protein mit zunehmender Anzahl von Untereinheiten und Domänen oder wenn die Ausbildung von Disulfidbrücken für die native Faltung essentiell ist (Skerra & Plückthun, 1991). Ebenso neigen komplexere Proteinfusionen häufig zur Aggregation oder zeigen eine Destabilisierung bzw. veränderte funktionelle Eigenschaften im Vergleich zu den Proteinen in isolierter Form (Chowdhury et al., 1998; Gleiter et al., 1999). Diese Größenlimitation genetischer Fusionen kann jedoch durch eine "Modularisierung" des Systems umgangen werden, indem man die zu verbindenden Komponenten separat herstellt und anschließend durch eine gerichtete Assoziation, vermittelt durch fusionierte Heterodimerisierungsmotive, miteinander kombiniert.

Der Einsatz dieser Motive zur artifizellen Assoziation von Proteinen ist keineswegs neu. Die in den letzten Jahren beschriebenen Anwendungen lassen sich im Wesentlichen drei Gebieten zuordnen. Dazu zählt die Erforschung zellulärer Prozesse, die eine spezifische Oligomerisierung von Proteinen involvieren, die Entwicklung künstlicher Antikörper mit neuen Antigen-Bindungseigenschaften und Mehrfachspezifitäten sowie die Generierung von neuartigen Systemen zur zielgerichteten Adressierung von therapeutischen Substanzen vermittelt durch Antikörper. Eine Übersicht der dazu eingesetzten Assoziationsmotive ist in Tabelle 2 gegeben.

Ein Teil dieser Motive vermitteln eine Homooligomerisierung der Fusionspartner, andere ausschließlich die Heterodimerisierung, mit einigen Modulen ist beides möglich. Je nach Anwendung erfolgte die Assoziation bereits *in vivo* oder auch *in vitro* anhand der gereinigten Komponenten. Dabei wurde die zugrundeliegende Interaktion in manchen Fällen durch eine künstlich eingeführte, intermolekulare Disulfidbrücke stabilisiert, während in anderen Fällen die nicht-kovalente Assoziation eine ausreichende Affinität aufwies.

Tabelle 2: Überblick ausgewählter Verfahren zur gerichteten Assoziation von Proteinen

Assoziationsmotiv	Assoziierte Komponenten	Oligomerisierungs- zustand	Anwendung	Referenz
		<b>coiled coils (leucine zipper)</b>		
GCN4	DHFR-Fragmente HIV-1 Glykoprotein GP41 <i>ectodomain</i>	Homodimer Homotrimer	Enzym-Reassemblierung lösliche Expression, Kristallisation	Pelletier et al., 1998 Weissenhorn et al., 1997
Fos/Jun	scFv-Fragmente Fab-Fragmente scFv-Fragmente	Homotetramer	tetravalente scFv-Antikörper bispezifische Antikörper bispezifische Mini-Antikörper	Pack et al., 1995 Kostelny et al., 1992 de Kruijf et al., 1996
ACID-p1/ BASE-p1	HLA-DR2 Domänen ( $\alpha/\beta$ ) extrazelluläre Domänen ( $\alpha/\beta$ ) des T-Zell-Rezeptor	Heterodimer	Studien MHCII-Komplex Expression und Assemblierung T-Zell-Rezeptor-Domänen	Kalandadze et al., 1996 Chang et al., 1994
WinZip-A2B1	Fv-Fragment ( $V_H/V_L$ )		stabilisiertes Fv-Fragment	Arndt et al., 2001
		<b>polyionische Fusionspeptide</b>		
E <sub>10</sub> SCP/R <sub>10</sub> C	Fab-Fragment/ $\alpha$ -Glucosidase	Heterodimer	Etablierung d. Verfahrens	Richter et al., 2001
E <sub>8</sub> C/R <sub>8</sub> C	VP1-Hüllprotein/dsFv-Fragment	Heterodimer	zelltypspez. Adressierung v. VLP	Stubenrauch et al., 2001
E <sub>8</sub> C/R <sub>8</sub> C	Toxin PE38/dsFv-Fragment	Heterodimer	modulares Immuntoxin	Kleinschmidt et al., 2003
		<b>sonstige Systeme</b>		
Streptavidin/ Biotin, Strep-tag	scFv-Fragment /biot. Fab-Fragment	Heterodimer	bispezifische Antikörper	Pearce et al., 1997
Calmodulin	scFv-Fragmente	Homotetramer	tetravalente scFv-Antikörper	Dübel et al., 1995
C <sub>III</sub> /C <sub>I</sub>	scFv-Fragment/Maltose-Bindeprotein	Heterodimer	Etablierung d. Verfahrens	Neri et al., 1995
FKBP/FRB/ Rapamycin	scFv-Fragmente ErbB1/ErbB2-Rezeptor-Tyrosinkinase	Heterodimer Homodimer/ Heterodimer	bispezifische scFv-Antikörper Untersuchung der Rezeptoraktivität von ErbB1/ErbB2-Dimeren	Müller et al., 1998a Muthuswamy et al., 1999
Rnase/S-Peptid	scFv-Fragmente	Heterodimer	bispezifische scFv-Antikörper	Dübel 1999
ProteinA (Z) / IgG	Fab-Fragment/Antikörper VP1-Hüllprotein/Antikörper	Heterodimer	bispezifische Antikörper zelltypspez. Adressierung v. VLP	Sanna et al., 1995 Gleiter et al., 2001
K/Q-Peptide	scFv-Fragment/Alkalische Phosphatase	Heterodimer	Etablierung d. Verfahrens	Takazawa et al., 2004

Das bestuntersuchte System basiert auf sogenannten *coiled coils*, die durch Assoziation von amphiphilen  $\alpha$ -Helices entstehen und leicht gewundene Helixbündel darstellen. Das zugrundeliegende *leucine zipper*-Motiv ist in zahlreichen DNA-bindenden Proteinen anzutreffen und vermittelt beispielsweise die regulatorisch bedeutsame Homo- bzw. Heterodimerisierung von eukaryontischen Transkriptionsfaktoren wie GCN4 sowie *Fos* und *Jun* (Landschulz et al., 1988; Kouzarides & Ziff, 1989; O'Shea et al., 1989a). Die molekularen Grundlagen der Interaktionen dieser etwa 30 Aminosäuren umfassenden  $\alpha$ -Helices sind gut untersucht. Sie beruhen auf Wechselwirkungen hydrophober Aminosäuren, wie Leucin und Isoleucin, die durch definierte Abstände in der Sequenz auf einer Seite der  $\alpha$ -Helix positioniert sind (Hu et al., 1990; O'Shea et al., 1991). Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer parallelen oder antiparallelen Assoziation von zwei  $\alpha$ -Helices nach dem Prinzip eines Reißverschlusses (*zipper*). Die Ausrichtung der Helices innerhalb eines *coiled coils* sowie ihre Tendenzen Homo- bzw. Heterodimere zu bilden werden durch spezifische, geladene Aminosäuren innerhalb des *leucine zipper*-Motivs bestimmt (O'Shea et al., 1992; Monera et al., 1993; Monera et al., 1994; Kohn et al., 1995).

In Anwendungen von *coiled coils* als Assoziationsmotiv wurden vorwiegend Peptide eingesetzt, die entweder von GCN4 bzw. *Fos* und *Jun* abgeleitet waren oder *de novo* für diese Zwecke entwickelt wurden (O'Shea et al., 1993; Tripet et al., 1996; Arndt et al., 2002; Litowski & Hodges, 2002).

In einigen Ansätzen wurden natürliche Oligomerisierungsdomänen durch *coiled coils* ersetzt, wie z.B. die Dimerisierungsdomäne des Phagen  $\lambda$  (Hu et al., 1990), die konstanten Regionen von Antikörpern (Kostelny et al., 1992; Arndt et al., 2001) und die Trimerisierungsdomäne des CD40-Liganden (Gurunathan et al., 1998; Morris et al., 1999). Eine andere Arbeit beschreibt die Trimerisierung der cytoplasmatischen Domäne von CD40, vermittelt durch die Fusion mit amphiphilen Helices, wodurch der oligomere Zustand des aktivierten Rezeptors imitiert werden konnte (Pullen et al., 1999). Des Weiteren wurden ähnliche Chimären mit extrazellulären Ketten des T-Zell-Rezeptors (Chang et al., 1994), mit Komponenten des MHCII-Komplexes von T-Zellen (Kalandadze et al., 1996) sowie den Glykoproteinen GP41 von HIV bzw. GP2 des Ebola-Virus (Weissenhorn et al., 1997; Weissenhorn et al., 1998) hergestellt. Ziel dieser Fusionen war stets die Gewinnung von aktiven Proteinchimären im Hinblick auf funktionelle und strukturelle Analysen sowie die Verbesserung von Löslichkeit und Stabilität dieser Proteine im Kontext ihrer rekombinanten Expression.

Die Oligomerisierung von Proteinen mit spezifischen Bindungseigenschaften stellt außerdem eine Strategie zur Erhöhung ihrer Affinität (Avidität) dar. So ist die *coiled coil*-vermittelte Dimerisierung und Tetramerisierung von Antikörperfragmenten (Pack & Plückthun, 1992; Pack et al., 1995) sowie die Pentamerisierung eines Peptidliganden beschrieben (Terskikh et al., 1997), die in Form ihrer Oligomere zu wesentlich affineren Bindemolekülen werden. Auch die Kombination mehrerer Antigenbindungseigenschaften ist möglich und wurde am Beispiel einer *coiled coil*-vermittelten Heterodimerisierung von zwei scFv-Dimeren mit unterschiedlichen Spezifitäten gezeigt. Auf diese Weise lassen sich bispezifische, dimere Antikörperfragmente herstellen, in denen die natürliche Avidität von Immunglobulinen erhalten bleibt (Müller et al., 1998a).

In einigen Arbeiten wird auch auf problematische Aspekte der Anwendung von *coiled coil*-Fusionen hingewiesen. Insbesondere im Zusammenhang mit dem *de novo*-Design von amphiphilen Helices wurde eine Anfälligkeit dieser Sequenzen gegenüber proteolytischem Abbau beobachtet (Arndt et al., 2000; Müller et al., 2000).

Ein alternatives Prinzip der Heterodimerisierung von Proteinen beruht auf den elektrostatischen Wechselwirkungen von fusionierten, polyionischen Aminosäuresequenzen wie z.B. Polyglutamat und Polyarginin. Dabei kann die Anziehung der entgegengesetzt geladenen Sequenzen eine spezifische Heterodimerisierung vermitteln, während die Abstoßung durch gleichartige Ladungen

eine Homodimerisierung verhindert. Erwartungsgemäß zeigt dieses Verhalten eine strikte Abhängigkeit von der Ionenstärke des Lösungsmittels (Richter et al., 2001). Ein Nachteil des Systems liegt in der Beobachtung, daß polyionische Fusionen (insbesondere polykationische Komponenten) vermehrt einem proteolytischen Abbau ausgesetzt zu sein scheinen.

Ungeachtet dessen wurde anhand von polyionischen Fusionspeptiden die gerichtete Assoziation von Antikörperfragmenten mit dem Enzym  $\alpha$ -Glucosidase (Richter et al., 2001), virusähnlichen Partikeln basierend auf dem Polyomavirus-Hüllprotein VP1 (Stubenrauch et al., 2001), dem *Pseudomonas*-Exotoxin PE38 (Kleinschmidt et al., 2003) sowie dem humanen GranzymB erreicht (Kurschus et al., 2004). Diese modular aufgebauten, bifunktionellen Proteinassoziate stellen interessante Systeme zur zelltypspezifischen Adressierung von therapeutischen Substanzen (eingeschlossen in virusähnliche Partikel oder in Form von Immuntoxinen) für die molekulare Therapie von Tumoren und anderen Krankheiten dar (Krauzewicz & Griffin, 2000; Pastan & Kreitman, 2002).

Andere Verfahren nutzen die Tetramerisierung von Streptavidin zur Herstellung von multivalenten und multispezifischen Antikörpern durch Fusion von scFv-Fragmenten an *core*-Streptavidin (Dübel et al., 1995; Kipriyanov et al., 1995). In Kombination mit der Affinität von Avidin/Streptavidin gegenüber Biotin bzw. Streptavidin-bindenden Peptidsequenzen (*strep tag*) ergeben sich vielfältige Möglichkeiten zur Generierung multifunktionaler, multispezifischer Proteinkomplexe für diagnostische und therapeutische Zwecke (Schmidt & Skerra, 1993; Weiss et al., 1994; Pearce et al., 1997). Abgesehen davon, findet dieses System aufgrund der hohen Affinität und Spezifität der Biotin/Avidin-Wechselwirkung seit geraumer Zeit eine breite Anwendung als isotopenfreies Markierungs- und Detektionssystem im Kontext verschiedener Methoden der biochemischen Grundlagenforschung (Savage et al., 1992).

Auf den Antikörper-bindenden Eigenschaften von Protein A aus *Streptococcus aureus* beruhen ebenfalls mehrere Ansätze zur spezifischen Assoziation von Immunglobulinen an entsprechende Fusionsproteine. Diese enthielten entweder das vollständige Protein A oder auch nur die Immunglobulin-bindende Domäne Z des Proteins. Die Kopplung von Antikörpern an diese Fusionsproteine diente dabei der Gewinnung bispezifischer Antikörper (Sanna et al., 1995) sowie der Antikörper-vermittelten, zelltypspezifischen Adressierung von virusbasierten Vektorsystemen für die Gentherapie (Ohno et al., 1997; Gleiter & Lilie, 2001).

Der Vollständigkeit halber sollen an dieser Stelle noch einige Proteinassoziationsverfahren genannt werden, deren Einsatz z.T. nur exemplarisch oder vor dem Hintergrund spezieller Anwendungen gezeigt wurde. So wurde die Calcium-abhängige Affinität von Calmodulin zu einem Calmodulin-bindenden Peptid genutzt, um heterodimere Proteinkomplexe von scFv-Fragmenten und dem Maltose-Bindeprotein (MBP) herzustellen (Neri et al., 1995).

Die spontane Rekonstitution von zwei Fragmenten der humanen, pankreatischen Rnase, fusioniert an jeweils ein Antikörperfragment, ermöglichte die Assoziation eines binären Immuntoxins (Dübel, 1999).

Weiterhin wurde die Tetramerisierungsdomäne des humanen Transkriptionsfaktors p53 verwendet, um scFv-Antikörperfragmente zu oligomerisieren (Rheinhecker et al., 1996; Willuda et al., 2001).

Fusionen von konstanten Antikörperdomänen ( $C_H/C_L$ ) erlaubten eine Heterodimerisierung von T-Zell-Rezeptorfragmenten (Eilat et al., 1992) sowie die Assemblierung von scFv-Fragmenten zu bi- und trispezifischen Antikörperderivaten (Schoonjans et al., 2000).

Ferner wird eine artifizielle Assoziation von zwei ErbB-Rezeptorfragmenten beschrieben, die jeweils an die Ligandenbindungsdomänen des humanen FK506-bindenden Proteins (FKBP) bzw. des FKBP-Rapamycin-assoziierten Proteins (FRAP) fusioniert wurden. Die Heterodimerisierung

wird dabei durch die Bindung beider Fusionsproteine an die Substanz Rapamycin induziert (Muthuswamy et al., 1999).

Obwohl sie im engeren Sinne keine reinen Heterodimerisierungsmotive darstellen, sollen im Kontext der gerichteten Kopplung von Proteinen noch zwei Verfahren genannt werden, die eine spezifische kovalente Verknüpfung von Proteinen erlauben.

Eine Methode involviert die enzymatische Aktivität der mikrobiellen Transglutaminase (MTG) von *Streptomyces mobaraensis*, die eine spezifische intermolekulare Quervernetzung (*Crosslinking*) von Lysin und Glutamin innerhalb bestimmter Peptidsequenzen vermitteln kann. Auf diese Weise wurden exemplarisch heterodimere Konjugate von verschiedenen GFP-Varianten hergestellt sowie Antikörper-Fragmente mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt (Tanaka et al., 2004; Takazawa et al., 2004).

Die als 'Protein-Ligation' bezeichnete Methode der Intein-basierten Kondensation von Peptiden und Proteinen beruht auf der Knüpfung einer spezifischen Peptidbindung zwischen dem N-terminalen Cystein eines Peptides oder Proteins und dem  $\alpha$ -Thioester eines zweiten Polypeptides. Dabei wird die Bildung des  $\alpha$ -Thioester durch die Protein-Spleiss-Aktivität des Inteins vermittelt. Die gerichtete Kopplung von Proteinen und Peptiden nach diesem Verfahren erlaubt beispielsweise die Inkorporation nicht-natürlicher Aminosäuren und anderer Moleküle sowie die partielle Isotopenmarkierung für strukturelle und funktionelle Analysen von Proteinen (Evans, Jr. & Xu, 1999; David et al., 2004).

Verfahren zur gerichteten Assoziation von Proteinen können einen wichtigen Beitrag zum kontrollierten Aufbau artifizierender Proteinkomplexe leisten. Ihre vielseitige Einsetzbarkeit in der Grundlagenforschung sowie der Entwicklung neuartiger therapeutischer Wirkstoffe wird aus zahlreichen Beispielen ersichtlich. Durch Verfügbarkeit weiterer Assoziationsmotive mit neuen Spezifitäten, kompaktem Ausmaß und guten Fusionseigenschaften ließe sich das Spektrum ihrer Anwendungen jedoch noch wesentlich erweitern. So könnte beispielsweise die Herstellung eines modularen Vektorsystems für die molekulare Therapie durch die parallele Verwendung mehrerer Heterodimerisierungsmotive besser kontrolliert und flexibler gestaltet werden (Abschnitt IV.2.5).

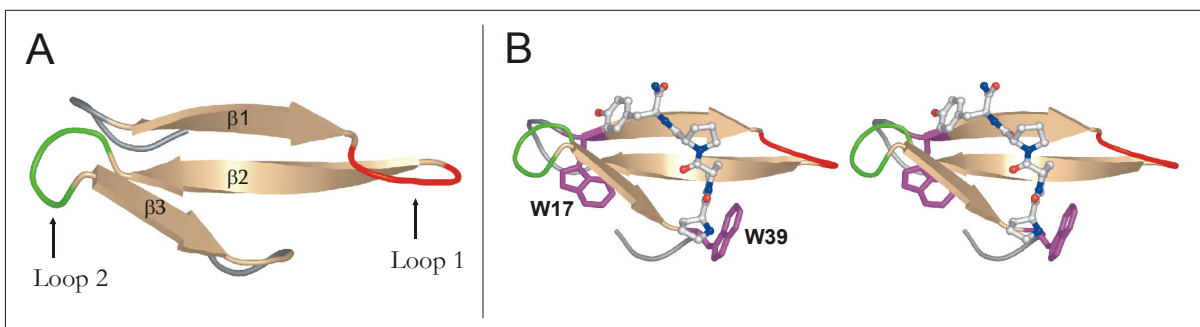
## I.2. WW-Domänen

Protein-Protein-Wechselwirkungen spielen eine wesentliche Rolle im Kontext der intrazellulären Signaltransduktion. Viele der daran beteiligten Proteine enthalten modulare Bindungsdomänen, die eine Assoziation der entsprechenden Proteinkomplexe vermitteln (Cohen et al., 1995; Pawson & Scott, 1997). Diese Interaktionsmodule stellen konservierte Bausteine dar, die von der Natur in die Architektur verschiedenster Proteinumgebungen integriert wurden (Das & Smith, 2000). Viele dieser etwa 30 bis 200 Aminosäuren großen Domänen agieren dabei als eigenständige Funktionseinheiten, die auch im isolierten Zustand ihre spezifische Bindungsaktivität gegenüber ihren Liganden behalten. Prominente Beispiele neben WW-Domänen sind SH2-, SH3-, PTB-, PDZ-, EVH1- sowie FF-Domänen (Sudol, 1998).

### I.2.1. Struktur und Funktion von WW-Domänen

WW-Domänen stellen Proteinmodule einer Größe von etwa 30 bis 40 Aminosäuren dar, deren Bezeichnung auf das Vorhandensein von zwei konservierten Tryptophanresten mit definiertem Abstand (20 bis 22 Aminosäuren, Abbildung 4) zurückgeht. Ihre Identifizierung erfolgte im Zusammenhang mit Analysen von Sequenzwiederholungen in der murinen Isoform des *Yes-kinase associated proteins* (Bork & Sudol, 1994; Sudol et al., 1995b). WW-Domänen vermitteln Protein-Protein-Wechselwirkungen durch ihre Affinität zu linearen, prolinreichen oder prolinhaltigen Aminosäuresequenzen und weisen damit eine funktionelle Ähnlichkeit zu SH3-Domänen auf (Chen & Sudol, 1995; Chan et al., 1996).

Die erste Struktur einer WW-Domäne wurde am Beispiel der humanen YAP-WW-Domäne im Komplex mit einem prolinreichen Liganden mittels NMR-Spektroskopie bestimmt (Macias et al., 1996). Kurze Zeit darauf gelang die Kristallstrukturaufklärung der WW-Domäne der humanen Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerase hPin1 (Ranganathan et al., 1997). Beide Strukturen zeigten in Übereinstimmung ein kompaktes, dreisträngiges, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, das eine flache Bindungstasche für die prolinhaltigen Liganden bildet (Abbildung 3). Die  $\beta$ -Stränge des Faltblattes sind jeweils durch kurze Loop-Abschnitte (*turns*) verbunden.



**Abbildung 3:** Struktur von WW-Domänen am Beispiel von hYAP-WW (PDB-ID: 1K9Q). **(A)** Die allgemeine Faltungstopologie zeigt ein konkaves, dreisträngiges  $\beta$ -Faltblatt, wobei die drei  $\beta$ -Stränge durch die Loops 1 (rot) und 2 (grün) verbunden sind. **(B)** Stereodarstellung der hYAP-WW-Domäne im Komplex mit dem Liganden PPPY. Die Ligandenbindung wird durch Aminosäuren auf der Oberseite des  $\beta$ -Faltblattes und von bestimmten Resten der Loopregionen vermittelt. Die namensgebenden, konservierten Tryptophane W17 und W39 sind violett markiert (Macias et al., 1996; Pires et al., 2001).

Die Verfügbarkeit von Strukturinformationen weiterer WW-Domänen im Komplex mit prolinreichen Liganden trug wesentlich zum Verständnis der molekularen Details bei, die der Bindung von prolinreichen Liganden durch WW-Domänen zugrunde liegen (Huang et al., 2000;

Verdecia et al., 2000; Kanelis et al., 2001; Pires et al., 2001). Für die spezifische Erkennung der Aminosäure Prolin des in einer Polyprolin-II-Helixkonformation vorliegenden Liganden, stellten sich konservierte Prinzipien heraus, die allen WW-Domänen gemeinsam sind. Dabei spielen vor allem aromatische Aminosäuren, wie z.B. Tryptophan W39 bzw. hydrophobe Reste im zweiten  $\beta$ -Strang der WW-Domäne (Positionen 28 und 30) eine wichtige Rolle (Abbildung 4, Nomenklatur nach Macias et al., 1996). Diese Aminosäuren bilden gemeinsam eine hydrophobe Bindungstasche für bestimmte Prolinreste des Liganden, wobei zusätzlich intermolekulare Wasserstoffbrücken die Bindung stabilisieren.

Prolinreiche Sequenzen enthalten fast ausnahmslos noch weitere Aminosäuren in unmittelbarer Nachbarschaft zu Prolin (z.B. Tyrosin, Leucin, Arginin oder Phosphoserin bzw. -threonin), für deren Erkennung bestimmte Reste in den Loop-Regionen der WW-Domänen verantwortlich sind (Zarrinpar & Lim, 2000). Basierend auf diesen Bindungsspezifitäten lassen sich WW-Domänen in verschiedene Klassen einordnen, worauf in Abschnitt I.2.2 näher eingegangen wird.

Der Bindung prolinreicher Sequenzen durch WW-Domänen liegen zumeist moderate Affinitäten zugrunde, repräsentiert durch Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich (Macias et al., 1996; Linn et al., 1997; Lu et al., 1999b; Kato et al., 2004). Diese Bindungseigenschaften spiegeln den transienten Charakter der Protein-Protein-Wechselwirkungen wider, die im Kontext zahlreicher zellulärer Prozesse eine präzise Modulation des Informationsflusses erlauben. Unter diesen Bedingungen ist allerdings eine hohe Spezifität dieser Interaktionen erforderlich, die trotz der geringen Affinität ausreichende Selektivitäten bei der Ausbildung der involvierten Proteinkomplexe gewährleisten müssen. Im Fall von WW-Domänen beruht diese Spezifität gegenüber prolinreichen Sequenzen auf dem besonderen Substitutionsmuster des Peptidrückgrates von prolinreichen Liganden: einer Abfolge von (regulären)  $C_{\alpha}$ -substituierten Aminosäuren und einem oder mehreren Prolinen, das mit seinem Pyrolidinring einen N-substituierten Rest darstellt. Bindungsstudien mit chemisch synthetisierten N-substituierten Analoga von Prolinliganden zeigten, daß die besondere Topologie der Bindungsoberfläche von WW-Domänen für die spezifische Erkennung N-substituierter Aminosäuren (unter den natürlichen Aminosäuren ausschließlich Prolin) verantwortlich ist. Dabei spielt die Geometrie der Prolinseitenkette wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle, vielmehr stellt die besondere Konformation des Peptidrückgrates prolinreicher Sequenzen das Kriterium für die Prolin-Spezifität dar (Nguyen et al., 1998).

WW-Domänen gehören zu den kleinsten derzeit bekannten Proteindomänen, die unabhängig von ihrer natürlichen Proteinumgebung zur Ausbildung ihrer charakteristischen Faltungstopologie, dem dreisträngigen  $\beta$ -Faltblatt, in der Lage sind (Macias et al., 1996). In dieser Eigenschaft stellen WW-Domänen bis heute attraktive Modellsysteme für die Untersuchung der Faltung und Stabilität sowie für das Proteindesign isolierter  $\beta$ -Faltblätter dar.

So wurde anhand von Struktur- und Stabilitätsanalysen von Mutanten der humanen YAP-WW-Domäne die Bedeutung des in allen WW-Domänen konservierten Tryptophanrestes W17 aufgeklärt. Gemeinsam mit den ebenfalls streng konservierten Resten P42 und Y29 bildet W17 ein hydrophobes Cluster auf der Unterseite des  $\beta$ -Faltblattes, der die Faltungstopologie der Domäne wie eine Klammer stabilisiert (vgl. Abbildung 36, Koepf et al., 1999a; Jäger et al., 2001). Kinetische Analysen mittels Temperatursprung-Experimenten erlaubten die nähere Untersuchung des Faltungsmechanismus der WW-Domänen hYAP-WW (Crane et al., 2000; Ferguson et al., 2001a), hPin1-WW (Jäger et al., 2001) sowie von mFBP28-WW bzw. einer künstlich generierten WW-Domäne (Ferguson et al., 2001b; Ferguson et al., 2001a; Nguyen et al., 2003). Darin zeigte sich eine extrem schnelle Strukturbildung im Faltungsprozeß isolierter WW-Domänen (im  $\mu$ s-Bereich), wobei offensichtlich die Ausbildung der Loopbereiche ( $\beta$ -hairpins) die geschwindigkeitsbestimmenden Prozesse darstellen. Daneben wurde der Faltungsweg in

Abhängigkeit von Mutationen der Domänen sowie denaturierenden Einflüssen (Temperatur, chaotrope Substanzen) analysiert. Sowohl in kinetischen Analysen als auch anhand von Gleichgewichtsmessungen stellte sich heraus, daß die reversible Entfaltung von WW-Domänen einem Zwei-Zustandsmodell folgt.

Andere Arbeiten beschreiben die Einbeziehung von Simulationen der Moleküldynamik, um strukturelle Determinanten der Stabilität und Faltung isolierter  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen zu untersuchen. Dabei stehen die Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit den Resultaten experimenteller Analysen (Ibragimova & Wade, 1999; Karanicolas & Brooks, III, 2003).

WW-Domänen standen zudem mehrfach im Mittelpunkt extensiven Proteindesigns, anhand dessen zahlreiche Varianten mit veränderten Eigenschaften bzw. völlig neue WW-Domänen entstanden. So wurde das Design einer artifiziellen WW-Domänen-Chimäre, basierend auf der Identifizierung konservierter Aminosäuren, beschrieben, die in strukturellen Analysen die charakteristische WW-Domänen-Faltungstopologie aufwies (Macias et al., 2000).

In anderen Ansätzen wurde eine signifikante thermodynamische Stabilisierung einer WW-Domäne durch rationales Design erreicht (Jiang et al., 2001), erfolgte die Evolution von hYAP-WW-Varianten mit erhöhter Bindungsaffinität durch *Phage Display* (Dalby et al., 2000) und wurden WW-Domänen basierend auf computergestützten Sequenzvorhersage-Algorithmen entworfen und experimentell analysiert (Kraemer-Pecore et al., 2003).

Anhand verschiedener zyklischer Varianten der hPin1-WW-Domäne konnte der Einfluß einer Peptidrückgrat-Fixierung auf die thermodynamische Stabilität von  $\beta$ -Faltblättern untersucht werden (Deechongkit & Kelly, 2002). In anderen Studien wurden nicht-natürliche Strukturkomponenten in die Loop-Regionen von hYAP-WW inkorporiert, um Aufschluß über elementare Schritte des Faltungsweges der Domäne zu erhalten (Ferguson et al., 2001b).

Die Methoden der festphasengestützten Peptid-Spot-Synthese in Kombination mit der 'nativen Peptidligation' ermöglicht heutzutage die vollständige *de novo*-Synthese von WW-Domänen. Anhand umfangreicher Spot-Bibliotheken von hYAP-WW konnte beispielsweise der Einfluß von Aminosäuresubstitutionen auf die Bindungseigenschaften gegenüber prolinreichen Liganden für jede Position der Domäne analysiert werden (Toepert et al., 2001; Toepert et al., 2003).

### I.2.2. Spezifische Bindungsmotive der WW-Domänen

Die biologische Aktivität der WW-Domänen besteht in der Erkennung und Bindung von prolinhaltigen bzw. prolinreichen Sequenzen. Anhand ihrer Bindungsspezifitäten lassen sich WW-Domänen in verschiedene Klassen einteilen, wobei in der Literatur mindestens drei Klassifizierungen teilweise kontrovers diskutiert werden, die sich in ihrer Einteilung unterscheiden (Sudol & Hunter, 2000; Otte et al., 2003; Hu et al., 2004). Die molekularen Zusammenhänge zwischen Sequenz und Bindungsspezifität von WW-Domänen wurden bisher nur für wenige Vertreter anhand von NMR- oder Kristallstrukturen ihrer Komplexe vollständig aufgeklärt. Die Klassifizierung der meisten WW-Domänen basiert daher auf *in vitro*-Bindungsstudien oder Analysen der Sequenzidentität bzw. -homologie.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine generelle Einteilung der WW-Domänen in vier Klassen (I bis IV) favorisiert (Abbildung 4, Sudol & Hunter, 2000). Die Liganden der Klassen I bis III bestehen aus mehreren, aneinandergereihten Prolinresten sowie einer Spezifitäts-bestimmenden Aminosäure, die gemeinsam in einer Polyprolin-II-Helix-Konformation vorliegen. Folgende Bindemotive in Liganden dieser Klassen lassen sich unterscheiden: PPxY (Klasse I, x repräsentiert eine beliebige Aminosäure, Chen & Sudol, 1995), PPLP (Klasse II, Bedford et al., 1997) und PPR (Klasse III, Bedford et al., 2000). Die Liganden der WW-Domänen-Klasse IV weisen dagegen keine Polyprolin-II-Helix-Konformation auf und enthalten als spezifisches Motiv phosphoryliertes Serin (pS) oder Threonin (pT), gefolgt von einem Prolinrest (Yaffe et al., 1997).



	15	20	25	30	35	40																									
<b>Hs Dystrophin</b>	QGP	WERAI	SPN	KVPYY	IN	HET	Q	TTTC	WDHPKM	*	P11532																				
<b>Hs YAP65-WW</b>	PAG	WEMAK	TSS	GQRYF	LN	HID	Q	TTTW	QDPRK	*	P46937																				
<b>Hs WWOX-WW1</b>	PPG	WEERT	TKD	GWVYY	AN	HTE	E	KTQ	WEHPKT		Q9NZC7																				
<b>Rn NEDD4-WW3</b>	PPG	WEERT	HTD	GRVFF	IN	HNI	K	KTQ	WEDPRL	*	Q62940																				
<b>Dm Sudx-WW1</b>	PDG	WEKKI	QSD	NRVYF	VN	HKN	R	TTQ	WEDPRT	+	Q8T0C8																				
➔ <b>Hs FBP11-WW1</b>	AKSM	WTE	HKS	PD	GRTYY	YN	T	ETK	QSTWEK	PDD	#	O75400																			
<b>Dm CG3542-WW1</b>	STE	WTE	HKA	PD	GRPY	YN	Q	NTK	QSSWEK	PEA		Q9VQK5																			
<b>Hs HYPC-WW1</b>	RAL	WSE	HVA	PD	GRIYY	YN	A	DDK	QSVWEK	PSV		O75401																			
<b>At FCA gamma</b>	KCT	WTE	H	TSPD	GFKYY	YN	G	L	TGESK	WEKPEE		O04425																			
<b>Ce HP1127-WW1</b>	DDA	WNE	FNA	PD	GRKYY	F	N	SIT	QENTWEK	PKA		Q86MP0																			
<b>Sc SYKL012P</b>	RGE	WQE	F	KTPA	GKKYY	YN	K	N	TQSRWEK	PNL		Q06525																			
<b>Mm FBP28-WW</b>	VSE	WTE	Y	KTAD	GKTY	YN	N	R	TLESTWEK	PQE	+	O14776																			
<b>Hs FBP11-WW2</b>	KCP	WKE	Y	KSDS	GKPY	YN	S	Q	TKESR	WAKPKE		O75400																			
<b>Hs CA150-WW1</b>	EEI	W	VENK	TPD	GKVYY	YN	A	R	TRESA	WTKPDG		O14776																			
<b>Hs Hyp109-WW1</b>	MGD	WQE	V	WDENT	GCYY	Y	W	N	TQ	TNEVTWEL	PQY		Q9N181																		
<b>Hs FE65/ABB1</b>	PAG	W	M	R	V	Q	D	T	S	G	T	Y	W	H	I	P	T	G	T	T	Q	W	E	P	P	G	R		O00213		
<b>Hs FBP21-WW1</b>	KGR	W	V	E	G	I	T	S	E	G	Y	H	Y	Y	D	L	I	S	G	A	S	Q	W	E	K	P	E	G		O75400	
<b>Sc Prp40-WW1</b>	MSI	W	K	E	A	K	D	A	S	G	R	I	Y	Y	N	T	L	T	K	K	S	T	W	E	K	P	K	E	+	P33203	
<b>Sc PRP40-WW2</b>	ENG	W	K	A	A	K	T	A	D	G	K	V	Y	Y	N	P	T	T	R	E	T	S	W	T	I	P	A	F	+	P33203	
<b>Hs PIN1-WW</b>	PPG	W	E	K	R	M	S	R	S	S	G	R	V	Y	Y	F	N	H	I	T	N	A	S	Q	W	E	R	P	S	*	Q13526
<b>Sc ESS1-WW</b>	PTP	W	T	V	R	Y	S	K	S	K	R	E	Y	F	F	N	P	E	T	K	H	S	Q	W	E	E	P	E	G		P22696
		β 1			β 2			β 3																							

**Abbildung 4:** Exemplarische Auswahl von WW-Domänen klassifiziert nach ihren Bindungsspezifitäten (Sudol & Hunter, 2000). Klasse I: PPxY-Motiv (blau), Klasse II: PPLP-Motiv (orange), Klasse III: PPR-Motiv (rot), Klasse IV: pSP/pTP-Motiv (grün). Die Bereiche der  $\beta$ -Stränge sind umrahmt. Die streng konservierten Reste W17, W39 und P42 sind fett gedruckt, die Spezifitäts-vermittelnden Aminosäuren wurden farbig hervorgehoben. Die grau unterlegten Positionen entsprechen Aminosäuren auf der Oberseite (Bindungsseite) des  $\beta$ -Faltblattes. Von einigen WW-Domänen sind Strukturen der freien Domäne (+) bzw. des Komplexes mit einem Liganden (\*) bekannt. Die Struktur von FBP11-WW1 (Pfeilmarkierung) im freien Zustand sowie im Komplex mit einem prolinreichen Liganden wurde im Rahmen dieser Arbeit bestimmt (#). Die letzte Spalte enthält den Eintragscode der Sequenz in der SwissProt-Proteindatenbank (<http://www.expasy.ch>). WW-Domänen der Klasse II standen im Mittelpunkt dieser Arbeit und sind daher zahlenmäßig überrepräsentiert.

Die molekulare Basis der Spezifität von WW-Domänen der Klasse I für das PPxY-Motiv wurde anhand der hYAP-WW-Domäne (Macias et al., 1996; Pires et al., 2001), der humanen Dystrophin-WW-Domäne (Huang et al., 2000) sowie der dritten WW-Domäne von Nedd4 (Kanelis et al., 2001) strukturell aufgeklärt. Die Interaktion mit den Prolinresten des Liganden beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen zur konservierten Prolinbindungstasche, die von Tryptophan W39 und der aromatischen Aminosäure an Position 28 (Y/F) der WW-Domänen gebildet wird. Dagegen basiert die Spezifität für Tyrosin im PPxY-Motiv auf drei Aminosäuren im Bereich von Loop 2 der WW-Domäne (Positionen 30, 32 und 35), die gemeinsam eine Tyrosin-Bindungstasche bilden. An Position 32 der WW-Domäne befindet sich stets Histidin, das in eine Wasserstoffbrücke mit dem Tyrosin des Liganden involviert ist.

Anhand der Kristallstruktur der humanen Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerase Pin1 in Gegenwart eines prolinhaltigen Liganden konnte die Spezifität von WW-Domänen der Klasse IV für phosphorylierte Liganden erklärt werden (Verdecia et al., 2000). Als wesentliche Determinanten stellten sich die Aminosäuren Arginin bzw. Lysin an den Positionen 20 und 23 im ersten  $\beta$ -Strang bzw. Loop 1 von hPin1-WW heraus, deren positive Ladungen die Phosphatgruppen der

phosphorylierten Serine oder Threonine koordinieren. Zusätzlich sind Serin-Seitenketten in Loop 1 der WW-Domäne an der spezifischen Erkennung des Liganden beteiligt.

Während sich die Klassen I und IV bezüglich ihrer Bindungsmotive klar abgrenzen lassen, ist die Einordnung von WW-Domänen der Klassen II und III deutlich umstrittener. Für diese Klassen sind zwar NMR-Strukturen in Form von isolierten WW-Domänen bekannt (FBP28WW und PRP40-WW-Tandem, Macias et al., 2000; Macias et al., 2002), vergleichbare Daten im Komplex mit entsprechenden Liganden existierten bisher jedoch nicht. Basierend auf Bindungsstudien mittels  $^1\text{H-NMR}$  und immobilisierten Peptidbibliotheken (Spots) wurde beispielsweise eine Unterteilung der Klasse III (PPR-Motiv) in zwei getrennte Kategorien vorgeschlagen und zusätzlich die Existenz einer weiteren Klasse von ausschließlich Polyprolin-bindenden WW-Domänen hypothetisiert. (Otte et al., 2003). Im Kontext einer anderen Arbeit wurde anhand vergleichender Oberflächenplasmonresonanz-Bindungsanalysen postuliert, daß die Klassen II und III kaum unterscheidbare Ligandenspezifitäten aufweisen und daher zu einer gemeinsamen Klasse zusammengefaßt werden sollten (Kato et al., 2004).

Die Ligandenspezifität von WW-Domänen der Klassen II und III ist bisher kaum verstanden. Mangels Vorhandensein struktureller Daten von entsprechenden Komplexen beruhen bisherige Erkenntnisse lediglich auf Bindungsstudien, Sequenzalignments und Strukturmodellierungen. So wurde für einige WW-Domänen der Klasse III (PPR-Motiv) die Beteiligung von negativ geladenen Aminosäuren in Loop 1 vorgeschlagen, die elektrostatische Wechselwirkungen zum Arginin im Liganden ausüben können. Die Basis der Spezifität von Klasse II für den hydrophoben Rest Leucin im PPLP-Motiv wurde bisher noch nicht untersucht, konnte aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher analysiert werden (Abschnitt III.2.5). Da in Bindungsstudien anderer Arbeiten keine Kreuzaffinität von FBP11-WW1 (Klasse II, PPLP) gegenüber PPR-Liganden (Klasse III) beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, daß beide Klassen über unterschiedliche Mechanismen zur spezifischen Ligandenerkennung verfügen (Macias et al., 2002; Otte et al., 2003; Kato et al., 2004).

Erst mit der Verfügbarkeit hochaufgelöster Strukturinformationen von WW-Domänen der Klassen II und III in Gegenwart verschiedener prolinreicher Liganden werden sich die molekularen Prinzipien besser verstehen lassen, die den Bindungseigenschaften dieser WW-Domänen zugrunde liegen.

### **I.2.3. Biologische Bedeutung von WW-Domänen**

WW-Domänen sind Protein-Protein-Wechselwirkungsmodule, die bisher ausschließlich in eukaryontischen Organismen identifiziert wurden. In Proteindatenbanken sind derzeit etwa 500 Proteine verzeichnet, die mindestens eine WW-Domäne aufweisen, davon entfallen etwa 115 Einträge auf humane Proteine (Pfam-Datenbank, <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>, Bateman et al., 2004).

WW-Domänen sind in viele Prozesse der zellulären Signaltransduktion involviert und vermitteln durch ihre Affinität zu prolinreichen Sequenzen die Assoziation von sowohl nukleären als auch cytoplasmatischen Multiproteinkomplexen, die beispielsweise in Prozessen der Zellzyklus-Kontrolle, der Modulation der Transkription, der mRNA-Reifung (Spleissen) und der Ubiquitynylierung von Proteinen eine wichtige Rolle spielen (Überblicksartikel: Sudol & Hunter, 2000; Kay et al., 2000; Sudol et al., 2001). Zudem erfuhren WW-Domänen in letzter Zeit zunehmende Beachtung, da ihnen ebenfalls eine Bedeutung im Kontext einiger Krankheiten wie z.B. dem Liddle-Syndrom, dem Rett-Syndrom, Duchenne- und Becker-Muskeldystrophie, der Huntington-Krankheit und Alzheimer zukommt (siehe auch Abschnitt I.2.4).

Bei der Modulation von nukleären Prozessen wie der Transkription wurden mehrere WW-Domänen-enhaltende Proteine als Transaktivatoren identifiziert. Das bestuntersuchte Beispiel stellt die Wechselwirkung der WW-Domäne des *yes kinase associated protein* (YAP) mit dem PPPY-Motiv des Transkriptionsfaktors PEBP2 dar (Sudol et al., 1995a). PPxY-Motive wurden auch in anderen Transkriptionsfaktoren gefunden (z.B. c-Jun, AP2 und NF-E2) und scheinen für die Transaktivierung von Bedeutung zu sein. So führte die Deletion dieser Motive in PEBP2 bzw. NF-E2 zur Aufhebung dieser Funktionalität (Mosser et al., 1998; Yagi et al., 1999). Offensichtlich bewirken die PPxY-Motive der Transkriptionsfaktoren eine Rekrutierung WW-Domänen-enhaltender Proteine wie YAP an den Ort der Transkription unter Bildung entsprechender Proteinkomplexe.

Im Gegensatz dazu wurde auch die negative Regulation der Transkription durch WW-Domänen-enhaltende Proteine beschrieben. So inhibiert beispielsweise PQBP-1 (bzw. Npw38) die Aktivierung der Transkription durch das Polyglutamin-haltige Protein Brn-2 (Waragai et al., 2000).

WW-Domänen sind auch im Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklus von Bedeutung. So enthält die humane Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerase Pin1 eine N-terminale WW-Domäne, die an prolinhaltige Sequenzen in Gegenwart von phosphorylierten Serin- bzw. Threoninresten (pS/pT) bindet (Yaffe et al., 1997). Die katalytische Domäne von hPin1 vermittelt anschließend die cis/trans-Isomerisierung von pSP- bzw. pTP-Bindungen und bewirkt damit eine Konformationsänderung in den gebundenen Proteinen. Diese Veränderung kann Einfluß auf die Aktivität, Dephosphorylierung oder subzelluläre Lokalisation des jeweiligen Proteins haben und ist beispielsweise für die Regulation der Phosphatase Cdc25 gut untersucht. In diesem Fall bindet hPin1 vermittelt durch die WW-Domäne das pTP-Motiv von Cdc25C, das infolge der cis/trans-Isomerisierung den G<sub>2</sub>/M-Übergang im Zellzyklus induziert (Lu et al., 1999b; Zhou et al., 2000). Dieser ist zudem eng mit der Transkription durch die RNA-Polymerase II verknüpft, deren Aktivität mit dem Phosphorylierungszustand ihrer carboxyterminalen Domäne (CTD) korreliert (Bregman et al., 2000). Die Phosphorylierung erfolgt an repetitiven SPTSPSY-Sequenzen der CTD durch eine Reihe von Kinasen (z.B. Cyclin-abhängige Kinasen) und moduliert die Bindung von WW-Domänen-enhaltenden Proteinen wie hPin1 und E3-Ubiquitin-Ligasen (z.B. Nedd4). Während die Interaktion von hPin1 auf phosphorylierten SP-Motiven der CTD beruht, wurde für Nedd4 eine bevorzugte Bindung an die dephosphorylierte CTD (PSY-Motiv) beobachtet (Sudol & Hunter, 2000; Chang et al., 2000). Phosphorylierung stellt in diesen Fällen ein wichtiges Regulationsprinzip bei der Bildung von Proteinkomplexen vermittelt durch WW-Domänen dar. Die Bindung von hPin1 resultiert höchstwahrscheinlich in einer Termination der Transkription, während der CTD/Nedd4-Komplex den Ubiquitin-vermittelten Abbauweg dieser Proteine im Proteasom initiiert (Rotin et al., 2000; Sudol et al., 2001).

WW-Domänen werden mit den molekularen Ursachen mehrerer Krankheiten assoziiert. So enthalten die im Zusammenhang mit Alzheimer auftretenden neurofibrillären Ablagerungen eine inaktive, hyperphosphorylierte Form des Mikrotubuli-assozierten Proteins *tau*, an dessen pTP-Motiv u.a. die WW-Domäne von hPin1 bindet. Im Gehirn der erkrankten Patienten kommt es dadurch zu einer Abreicherung von hPin1, was zum mitotischen Arrest und apoptotischen Zelltod der betroffenen Neuronen führt. Allerdings konnte auch gezeigt werden, daß hPin1 durch seine Bindung an das hyperphosphorylierte *tau* dessen ursprüngliche Funktionalität (Stimulierung der Mikrotubuli-Assoziation) unter bestimmten Bedingungen wiederherstellen kann (Lu et al., 1999a).

Das WW-Domänen-enhaltende Protein Fe65 wird ebenfalls in Verbindung mit der Alzheimerschen Krankheit gebracht. Für Fe65 wurde die Phosphotyrosin-vermittelte Interaktion mit dem *β-amyloid precursor protein* (APP) beschrieben, aus dem im Verlauf der Krankheit das

durch proteolytische Spaltung von APP das  $\beta$ -Amyloid-Peptid ( $A\beta$ ) gebildet wird (Russo et al., 1998). Vermittelt durch die WW-Domäne von Fe65 erfolgt der Transport des Fe65/APP-Komplexes in den Zellkern, wo Fe65 durch Bindung an verschiedene Transkriptionsfaktoren die Genexpression anschaltet (Minopoli et al., 2001; Perkinson et al., 2004).

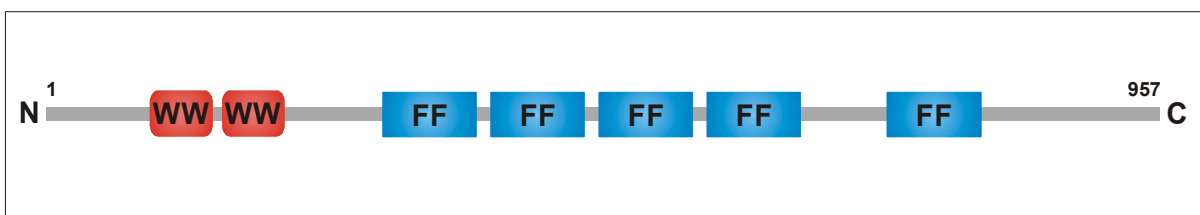
An der Interaktion zwischen Dystrophin und  $\beta$ -Dystroglycan, einem Bindeglied zwischen extrazellulärer Matrix und Cytoskelett, ist ebenfalls eine WW-Domäne bzw. prolinreicher Ligand (PPxY-Motiv) beteiligt, deren gemeinsamer Komplex strukturell aufgeklärt wurde (Bork & Sudol, 1994; Bork & Sudol, 1994). Wird diese Wechselwirkung durch Mutationen im C-terminalen Bereich von Dystrophin beeinträchtigt, so äußert sich das in verschiedenen Formen von Muskel-Fehlbildungskrankheiten, z.B. Duchenne- und Becker-Muskeldystrophie (Koenig et al., 1989; Roberts et al., 1992).

Außerdem zeigte sich am Beispiel von  $\beta$ -Dystroglycan ein weiteres Mal die Regulierbarkeit der Wechselwirkung zwischen WW-Domäne und prolinreichem Ligand. So wurde durch Phosphorylierung des Tyrosin-Restes im PPxY-Motiv von Dystroglycan die Bindung an Dystrophin unterbunden, statt dessen erfolgte eine Rekrutierung von SH2-Domänen-enhaltenden Proteinen, die spezifisch Phosphotyrosin erkennen (Sotgia et al., 2001).

Die WW-Domänen von E3-Ubiquitin-Ligasen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation epithelialer Natrium-Kanäle (ENaC) im Rahmen der physiologischen Elektrolyt-Homöostase. Der ENaC-Komplex besteht aus drei homologen Untereinheiten ( $\alpha/\beta/\gamma$ ), die am C-Terminus jeweils ein PPxY-Motiv aufweisen. An diese Sequenzen binden WW-Domänen-haltige Proteine, wie z.B. die Nedd4-Familie der E3-Ubiquitin-Ligasen (Staub et al., 1996). Sie katalysieren die Übertragung von Ubiquitin auf einen Lysinrest im C-terminalen Bereich von ENaC und initiieren damit die Internalisierung und den lysosomalen Abbau des Proteinkomplexes, wodurch die Anzahl der aktiven Natriumkanäle herabgesetzt wird (Ingham et al., 2004). Mutation oder Verlust des PPxY-Motivs in den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten von ENaC führt zu einer mit Bluthochdruck (Hypertension) verbundenen Krankheit, die als Liddle-Syndrom bezeichnet wird (Schild et al., 1996). Aufgrund der beeinträchtigten Wechselwirkung zwischen dem PPxY-Motiv der ENaC-Untereinheiten und einer WW-Domäne in Nedd4 ist die negative Regulation der Natriumkanäle gestört und es kommt zu einer erhöhten  $Na^+$ -Aufnahme, die zu Hypertension führt.

#### I.2.4. Das Formin-bindende Protein 11 (FBP11)

Das Formin-bindende Protein 11 (FBP11, alternative Bezeichnungen: HypA und *formin binding protein 3* bzw. FNBP-3) weist mit zwei WW-Domänen (ca. 30 Aminosäuren/Domäne) sowie fünf FF-Domänen (50-60 Aminosäuren/Domäne) einen modularen Aufbau auf (Abbildung 5), der sich zwischen Mensch, Maus und anderen Vertebraten kaum unterscheidet (Bedford & Leder, 1999, Uniprot-Datenbank: <http://www.ebi.uniprot.org>).



**Abbildung 5:** Modulare Architektur des humanen Formin-bindenden Proteins 11 (Uniprot-ID: FNB3\_HUMAN). Das murine FBP11 zeigt einen nahezu identischen Aufbau (Uniprot-ID: FNB3\_MOUSE). Das Größenverhältnis der schematisch abgebildeten WW- und FF-Domänen bzgl. des Gesamtproteins wurde aus Gründen der Darstellung verändert (Uniprot-Sequenzdatenbank: <http://www.ebi.uniprot.org>).

FBP11 wurde erstmals anhand seiner beiden WW-Domänen (WW1, WW2) bei der Suche nach Bindungspartnern der murinen Formine identifiziert (Chan et al., 1996). Die Proteinfamilie der Formine umfaßt eine Reihe von nukleären Phosphoproteinen, die im Rahmen der Embryonalentwicklung für eine korrekte Ausbildung von Gliedmaßen und Organen erforderlich sind (Woychik et al., 1990). Sie enthalten kurze prolinreiche Sequenzen, über die sie sowohl mit bestimmten SH3- als auch den WW-Domänen der Formin-bindenden Proteine (z.B. FBP11, FBP21, FBP28) Interaktionen eingehen können und dadurch Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln. (Chan et al., 1996; Bedford et al., 1997).

In Bindungsstudien gelang die Isolierung weiterer, teilweise unbekannter Bindungspartner von FBP11, deren Sequenzalignment einen gemeinsamen prolinreichen Abschnitt von etwa 10 Aminosäuren mit dem Konsensusmotiv PPLP zeigte. Die Bindung von FBP11 an PPxY-Liganden (z.B. von YAP-WW) konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich stellte sich heraus, daß bereits der Sequenzabschnitt einer einzelnen WW-Domäne hinreichend ist, um prolinreiche Sequenzen binden zu können. Dabei wies FBP11-WW1 im Vergleich zu FBP11-WW2 eine höhere Affinität zu einem von Formin abgeleiteten Peptidliganden auf (Bedford et al., 1997).

Neben den beiden WW-Domänen WW1 und WW2, die durch 15 Aminosäuren voneinander getrennt sind, enthält FBP11 fünf FF-Domänen, deren Bezeichnung sich von der Existenz konservierter Phenylalanin-Reste ableitet. FF-Domänen sind häufig in Kombination mit WW-Domänen in verschiedensten Proteinen anzutreffen und vermitteln ebenfalls Protein-Protein-Wechselwirkungen (Bedford & Leder, 1999). Bisherige Untersuchungen lassen darauf schließen, daß FF-Domänen an der Bindung phosphorylierter Sequenzen beteiligt sind. So wurde die Interaktion einer FF-Domäne des Transkriptionsfaktors CA150 (der ebenfalls zwei WW-Domänen enthält) mit der phosphorylierten carboxyterminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II beschrieben, die vermutlich für die Regulation der Transkription von Bedeutung ist (Carty et al., 2000). Die Struktur der ersten FF-Domäne von FBP11 konnte mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden und zeigte eine neuartige Topologie innerhalb der Familie der Phosphopeptid-bindenden Domänen (Allen et al., 2002).

Die Funktion des nukleären Proteins FBP11 ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Einer der Interaktionspartner von FBP11 wurde jedoch als Säuger-Spleissfaktor SF1 identifiziert und impliziert eine Beteiligung von FBP11 an den im Zellkern stattfindenden Vorgängen des prä-mRNA-Spleissens (Bedford et al., 1997). Darauf weist auch der Aufenthaltsort von FBP11 im Zellkern hin, das in bestimmten granulären Bereichen des Nukleus nachgewiesen werden konnte und dort mit verschiedenen Komponenten des Spleissosoms kolokalisiert ist (Mizutani et al., 2004).

Außerdem existieren auffallende Parallelen zwischen FBP11 und dem Spleissfaktor PRP40 (*pre mRNA processing protein 40*) aus *S.cerevisiae*, der in die Intron-Überbrückung im Rahmen des Spleissprozesses involviert ist. In Assoziation mit dem Hefe-Spleissfaktor BBP (*branchpoint bridging protein*) bringt PRP40 die 5'- und 3'-Spleissstellen der Introns in räumliche Nähe und vermittelt damit einen wesentlichen Schritt beim Aufbau des Spleissosoms (Kramer, 1996; Will & Luhrmann, 1997). Der FBP11-Bindungspartner SF1 gilt als das Säuger-Homologe von BBP, was die Hypothese untermauert, daß die Komponenten des Spleiss-Apparates zwischen Säugern und Hefe konserviert sind (Berglund et al., 1997; Abovich & Rosbash, 1997). Dementsprechend werden auch FBP11 und PRP40 als homologe Proteine angesehen, worauf auch die ähnliche Architektur beider Proteine hinweist. Wie FBP11 verfügt auch PRP40 über zwei N-terminale WW-Domänen und mehrere FF-Domänen im C-terminalen Bereich des Proteins (Bedford et al., 1998; Bedford & Leder, 1999).

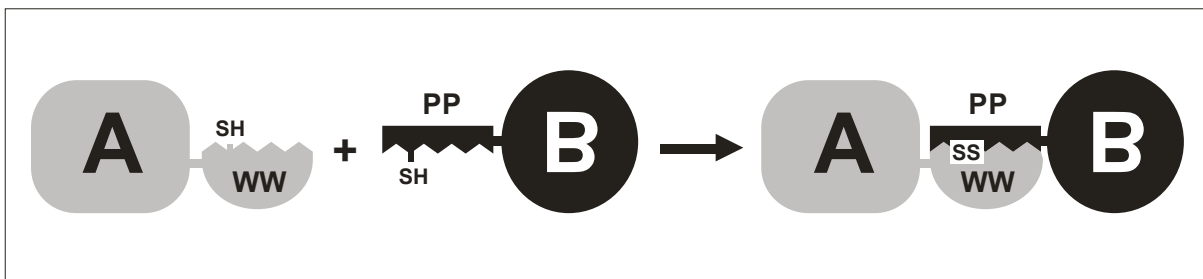
Interessanterweise scheint FBP11 neben der postulierten Funktion als Spleissfaktor noch in Wechselwirkungen mit einer Reihe weiterer, zellulärer Proteine involviert zu sein. So wurde FBP11 als Interaktionspartner von Huntingtin identifiziert, das mit der neurodegenerativen Huntington-Krankheit in Verbindung gebracht wird (Faber et al., 1998). Die mit der Krankheit assoziierte Polyglutamin-Elongation in Huntingtin führt zu einer Beeinflussung der Wechselwirkungen zwischen Huntingtin und FBP11 sowie anderen WW-Domänen-enthaltenden Proteinen, die an prolinreiche Abschnitte des Proteins binden (Passani et al., 2000).

In einer anderen Arbeit wird FBP11 eine Rolle bei der Reorganisation des Cytoskeletts zugeschrieben. Die durch N-WASP (*neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*) vermittelte Aktin-Polymerisation im Cytoplasma unterliegt offensichtlich einer negativen Regulation im Zellkern, die auf einer WW-Domänen-vermittelten Bindung von N-WASP und FBP11 beruht. Dabei scheint die nukleäre bzw. cytoplasmatische Lokalisation von N-WASP durch FBP11 moduliert zu werden (Mizutani et al., 2004).

Eine weitere medizinisch relevante Interaktion von FBP11 wurde in einer Studie der molekularen Ursachen des Rett-Syndroms beschrieben (Bedford et al., 1997; Buschdorf & Stratling, 2004). Diese neurologische Krankheit beruht auf dem Funktionsverlust des nukleären Proteins MeCP2 (*methyl CpG-binding protein 2*), das die Erkennung methylierter DNA-Abschnitte vermittelt. Die mit dem Rett-Syndrom verbundenen Leseraster-Verschiebungen und Mutationen im C-terminalen, prolinreichen Segment von MeCP2 führen zur Aufhebung der Bindungseigenschaften gegenüber den WW-Domänen von FBP11. Der zellbiologische Hintergrund der FBP11-MeCP2-Interaktion ist allerdings noch völlig unbekannt (Buschdorf & Stratling, 2004).

### I.3. Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Verfahren zur spezifischen Kopplung von Proteinen entwickelt werden, deren Assoziation durch ein neuartiges Heterodimerisierungsmotiv, basierend auf WW-Domänen und prolinreichen Sequenzen, vermittelt wird. Die natürliche Affinität dieser kompakten Proteinbindungsdomäne gewährleistet die Spezifität der Assoziation, während die Stabilisierung des heterodimeren Komplexes durch Ausbildung einer artifiziellen Disulfidbrücke zwischen WW-Domäne und Prolinsequenz erreicht werden soll (Abbildung 6). Die vorgelagerte Bindung sollte zu einer Erhöhung der lokalen Konzentrationen beider Kopplungspartner führen und die Ausbildung einer (spezifischen) intermolekularen Disulfidverbrückung begünstigen.



**Abbildung 6:** Prinzip der gerichteten, kovalenten Assoziation von zwei Proteinen A und B vermittelt durch die Affinität von fusionierter WW-Domäne (WW) und prolinreicher Sequenz (PP). Der heterodimere Komplex der Fusionsproteine wird durch eine Disulfidbrücke (SS) stabilisiert.

Ausgehend von vorangegangenen Arbeiten zur nicht-kovalenten Assoziation von Polyprolin- und WW-Domänen-Fusionsproteinen (Schmidt et al., 2001; Günther et al., 2001) sollte die Wechselwirkung der WW-Domäne FBP11-WW1 mit prolinreichen Liganden genauer charakterisiert und für die Anwendung als Kopplungssystem wie beschrieben modifiziert werden.

FBP11-WW1, als Vertreter der WW-Domänen-Klasse II, bindet prolinreiche Liganden, die ein PPLP-Motiv enthalten (Bedford et al., 1997). Die biophysikalischen Parameter von Struktur und Bindungseigenschaften dieser WW-Domäne sind bisher kaum untersucht und sollten im Rahmen ihrer Verwendung als Heterodimerisierungsmotiv eingehender analysiert werden. Eine besondere Herausforderung stellte in diesem Zusammenhang die Aufklärung der Struktur von FBP11-WW1 im isolierten und Liganden-gebundenen Zustand dar, da von Komplexen dieser WW-Domänen-Klasse bisher keine strukturellen Daten verfügbar waren und die molekularen Grundlagen ihrer Bindungsspezifität kaum verstanden sind.

Die Entwicklung des Protein-Kopplungssystems erforderte das Design einer artifiziellen Disulfidbrücke in die direkte oder nähere Umgebung des natürlichen Bindungsinterfaces von WW-Domäne und Prolinligand. Unter Erhalt der spezifischen Bindungseigenschaften sollten zunächst geeignete Cysteinvarianten von FBP11-WW1 und PPLP-Liganden generiert werden. Anhand dieser Varianten sollten anwendungsrelevante Parameter der Kopplung identifiziert und das System näher charakterisiert werden. Insbesondere war es von Interesse, den Einfluß der WW-Domänen-vermittelten Affinität auf die Stabilität der Disulfidbrücke zu quantifizieren und deren Abhängigkeit von den Redoxbedingungen zu untersuchen.

Durch eine kovalente Assoziation geeigneter Modellproteine sollte schließlich die prinzipielle Anwendbarkeit des Systems auf Proteinebene evaluiert werden und die Effizienz des Verfahrens bei der Herstellung komplexerer Assoziante bewertet werden.

## II. Material und Methoden

### II.1. Geräte und Zubehör

Gerätebezeichnung	Hersteller /Vertrieb
CD-Spektrometer Modell 62A DS	AVIV (Lakewood, USA)
<i>Differential Scanning</i> Mikrokalorimeter VPDSC	MicroCal (Northampton, USA)
DNA-Sequenziergerät Li-Cor 4000	MWG Biotech (Ebersberg)
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	Biorad (München)
Fluoreszenzspektrometer Fluoromax 2/3	Spex Instruments (Edison, USA)
FPLC-Anlage Äkta Explorer 100	Amersham Biosciences (Freiburg)
Gefriertrocknungsanlage Modell Beta 1-16	Martin Christ (Osterode)
Hochdruckhomogenisator Gaulin Micron Lab 40	APV (Lübeck)
HPLC-Anlage	Dionex (Idstein)
NMR-Spektrometer DRX600	Bruker (Bremen)
Peltier-Thermostat LFI-3751	Wavelength Electronics (Edison, USA)
SPOT-Peptid-Synthesizer APS 222	Abimed (Langenfeld)
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg)
UV/VIS Spektrometer DU 640	Beckman (München)
Zentrifugen Avanti J-20, J-25 und J-30I	Beckman (München)
Säulen & Säulenmaterialien	Hersteller /Vertrieb
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences (Freiburg)
Licrospher 100 RP (C18) HPLC-Säule	Merck (Darmstadt)
Ni-NTA His Bind Resin	Qiagen (Hilden)
ProteinRP <i>Reversed Phase</i> HPLC-Säule	YMC Europe (Schermbbeck)
Source 15 RPC	Amersham Biosciences (Freiburg)
Superdex S-75 Gelfiltrationssäule	Amersham Biosciences (Freiburg)
TSKGel G3000SW HPLC-Gelfiltrations-Säule	Toso Bioscience (Stuttgart)
Sonstiges	Hersteller /Vertrieb
Amino-PEG <sub>500</sub> Cellulose-Membran	Hartmann Analytic (Braunschweig)
BIACore CM5-Sensorchip	BIACore AB (Freiburg)
Dialyseschläuche	Roth (Karlsruhe)
Zentrifugationskonzentrator Amicon-Ultra 15	Millipore (Schwalbach)

Geräte der Standardlaborausstattung wurden nicht aufgeführt. Auf spezielle Geräte, die für diese Arbeit von besonderer Bedeutung waren, wird im Methodenteil näher eingegangen.



## II.2. Chemikalien, Enzyme, Kits

Chemikalien	Bezugsquelle
<sup>15</sup> N-Ammoniumchlorid	Campro (Veenendaal, Niederlande)
Blockierungsreagenz	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce (Rockford, USA)
<sup>13</sup> C-Glucose	Prof. Hartmut Oschkinat (FMP, Berlin)
Fmoc-Aminosäuren-Pentafluorphenylester	Novabiochemtech (Beeston, UK)
Glutathion, oxidiert	Roche Diagnostics (Penzberg)
Glutathion, reduziert	ICN (Meckenheim)
Enzyme & Molekulargewichtstandards	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs (Frankfurt/M.)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt/M.)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt/M.)
Thrombin (bovin)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Streptavidin-Peroxidase-Konjugat	Roche Diagnostics (Penzberg)
100 bp/1Kbp DNA-Molekulargewichtstandards	New England Biolabs (Frankfurt/M.)
<i>Broadrange</i> Protein-Molekulargewichtstandard	New England Biolabs (Frankfurt/M.)
LMW Protein-Molekulargewichtstandard	Amersham Biosciences (Freiburg)
Kits	Bezugsquelle
<i>pCR-Blunt II-TOPO Cloning Kit</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>Qiagen Plasmid Mini Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>QIAquick Minelute Gel Extraction Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>SequiTherm ExceIII Long-Read DNA Sequencing Kit</i>	Epicentre Technologies (Madison, USA)

Sämtliche Chemikalien entsprachen – sofern nicht anders vermerkt – dem Reinheitsgrad p.A. Gängige Substanzen und Nährmedien, die hier nicht aufgeführt sind, wurden von Roth, Sigma-Aldrich, Merck, ICN bzw. Applichem bezogen. Die Herstellung von wässrigen Lösungen erfolgte mit Millipore-Wasser.

### II.3. Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mrr hsdRMS- mcrBBC</i> ), $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ <i>lacX74 recA1, deoR, araD139, \Delta(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU, galK, rpsL, (Str<sup>R</sup>) endA1, nupG</i></i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B, F <sup>-</sup> , <i>ompT, gal, [dcm], [lon], hsdSB(rB-mB), gal</i> (DE3)	Novagen (Bad Soden)

### II.4. Plasmide

Plasmide	Bezugsquelle
pCR-Blunt II-TOPO	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pEGFP-N1	BD Biosciences Clontech (Heidelberg)
pGEX-2T	Amersham Biosciences (Freiburg)
pGEX-2TK-WW	Mark Bedford (HMS, Boston, USA)
pET15b	Novagen (Bad Soden)
pET15b-CD4PP	Christiane Jäger (MLU Halle)

### II.5. Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
WW D25C sense	CAT AAA TCA CCT TGT GGA AGG ACT TAT
WW D25C antisense	ATA AGT CCT TCC ACA AGG TGA TTT ATG
WW K35C sense	ACA ATA CAG AAA CAT GTC AGT CTA CCT GG
WW K35C antisense	CCA GGT AGA CTG ACA TGT TTC TGT ATT GT
WW AKSM sense	TCT GTT GGA TCC GCG AAG AGC ATG TGG ACA GAA CAT A
WW AKSM antisense	TAT GTT CTG TCC ACA TGC TCT TCG CGG ATC CAA CAG A
GFP-5- <i>NdeI</i>	ACC GGT CGC CCA TAT GGT GAGA CAA GG
GFP-3- <i>Bsu36</i>	TTA TAT TAA TCC TGA GGC ACC CTT GTA CAG CTC GTC C
GFP-5- <i>Bsu36</i>	TAA GAA TAG TCC TCA GGC ATG GTT AGC AAG GGC GAG
GFP-3- <i>BamHI</i>	CTG TAC AAG TAA TAG GAT CCC GAC TCT AGA TC
PP-5- <i>NdeI</i>	CTA GTG TTC CAT ATG AGC TCC GGT CCG
PP-3- <i>Bsu36</i>	ATA TTA ACA TCC TGA GGC TCC TGG TGG CAG TGG TGG
PP-5- <i>Bsu36</i>	ATA TTA CAG GCC TCA GGT AGC TCC GGT CCG C
PP-3- <i>BamHI</i>	CGG GAT CCC TAT TAG CTA CCG CT
C-PP-GFP sense	GGC AGC CAT ATG AGT TGT TCA GGT CCG CCG CCA C
C-PP-GFP antisense	GTG GCG GCG GAC CTG AAC AAC TCA TAT GGC TGC C
GFP-C-PP forward	GGC GGA CCG GAG CAA CCT GAG GCA CCC
GFP-PP-C forward	CCC TAT TAG CTA CAG CTT CCT GGT GGC AG
GFP-PP reverse	GCA TGC AAG GAG ATG GCG CCC AAC AGT C
Seq T7 Terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G
Seq T7 Promoter	CGA AAT TAA TAC GAC TCA C
Seq pGEX	GAA ATC CAG CAA GTA TAT AGC ATG G
Seq M13 forward	GAC GTT GTA AAA GGA CGG CCA G
Seq M13 reverse	CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC

Die Planung der Oligonukleotide erfolgte mit dem Programm *GeneRunner* und wurden HPSF- bzw. HPLC-gereinigt von den Firmen MWG (Ebersberg) bzw. Metabion (Martinsried) bezogen. Die mit 'Seq' bezeichneten Oligonukleotide wurden für die DNA-Sequenzierung eingesetzt und enthielten eine IRD-800-Markierung am 5'-Ende.

## II.6. Lösliche Peptide

**Tabelle 3:** Übersicht über Bezeichnung, Sequenz und Molekularmasse der in der vorliegenden Arbeit verwendeten synthetischen Peptide. Das für FBP11-WW1 spezifische Leucin sowie die zur Disulfidverbrückung eingeführten Cysteine sind besonders hervorgehoben (fett gedruckt bzw. grau unterlegt).

Bezeichnung	Sequenz (N → C)	Molekularmasse (Da) <sup>1</sup>
PPN1	GPP P <b>P</b> P P <b>P</b> L P	965.2
PPN2	β-A GPP P <b>P</b> P P <b>P</b> L PP	1133.4
PPN3	β-A GPP P <b>P</b> P P <b>P</b> L P <b>P</b> P	1230.5
PPN4	AP PTP P <b>P</b> L PP	983.2
PPC1	S GCG SGS GSP P <b>P</b> P P <b>P</b> L P	1490.6
PPC2	CSG P <b>P</b> P P <b>P</b> P P <b>P</b> L P	1252.5
PPC3	CSG P <b>P</b> P P <b>P</b> P P <b>P</b> L PP	1349.6
PPC4	GCP P <b>P</b> P P <b>P</b> L P	971.2
PPC5	SGC P <b>P</b> P P <b>P</b> L PP	1058.3
PPC6	GPP C <b>P</b> P P <b>P</b> L P	971.2
PPC7	GGP P <b>P</b> C P <b>P</b> L P	931.1
PPC8	GGP P <b>P</b> P P <b>C</b> L P	931.1
PPC9	GGP P <b>P</b> P P <b>P</b> L C	931.1
PPC10	GPP P <b>P</b> L P <b>P</b> G C	931.1
CTR-N	CGL GPG LGP G	827.0

<sup>1</sup> durchschnittliche Masse (*average mass*), lt. 'PeptideMass', [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)

Die hier aufgeführten Peptide wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. Frank Bordusa (Max-Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) bzw. Dr. Sven Rothmund (IZKF Leipzig) synthetisiert und zum Teil in gereinigter Form zur Verfügung gestellt. Andernfalls wurde die Abspaltung der synthetisierten Peptide von der Festphase sowie die weitere Aufreinigung durchgeführt wie im Methodenteil (Abschnitt II.11.1.) beschrieben.

## II.7. Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ammoniumbicarbonatpuffer	0.1 M Ammoniumbicarbonat, pH 7.8
Citratpuffer (Biotinylierung)	50 mM Natriumcitrat, pH 5.2
ECL-Lösung A	1 ml 250 mM Luminol (DMSO); 0,44 ml 90 mM Coumarsäure (DMSO); 10 ml 1 M TrisHCl, pH 8,5; 88,56 ml Wasser
ECL-Lösung B	64 µl 30% (v/v) Wasserstoffperoxid; 10 ml 1 M TrisHCl, pH 8,5; 89,94 ml Wasser
ECL-Substratlösung	1 ml ECL-Lösung A, 1 ml ECL-Lösung B
GST Auftrags-/Waschpuffer	8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.15 g/l Dinatriumhydrogenphosphat, 0.2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7.4
GST Elutionspuffer	50 mM Tris, pH 8.0, ggf. 10 mM GSH
Laufpuffer SDS-PAGE	50 mM Tris, 380 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.3
Laufpuffer Agarose-Gele	40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8.1
Ni-NTA Auftragungspuffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0
Ni-NTA Elutionspuffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8.0
PAGE-Färbelösung	10% (v/v) Essigsäure, 0.006% (w/v) Coomassie Brillant Blau G250
PAGE Fixierer	10% (v/v) Essigsäure, 25% (v/v) 2-Propanol
PAGE Entfärbelösung	10% (v/v) Essigsäure
PAGE 6% Sammelgel (für 3 Gele)	1,2 ml 30% Polyacrylamid/0,8%Methylenbisacrylamid, 1,5 ml Sammelgelpuffer SDS-PAGE, 3,3 ml Wasser, 25 µl 10% APS-Lösung, 7 µl TEMED
PAGE 15% Trenngel (für 3 Gele)	5 ml 30% Polyacrylamid/0,8%Methylenbisacrylamid, 2,5 ml Trenngelpuffer SDS-PAGE; 2,5 ml Wasser, 35 µl 10% APS-Lösung, 7 µl TEMED
Probenpuffer SDS-PAGE (reduzierend)	2 ml Sammelgelpuffer, 2 ml 16 % (w/v) SDS, 4 ml Glycerin, 2 ml 0.2 % (w/v) Bromphenolblau, 2 ml 2-Mercaptoethanol, pH 6.8
Probenpuffer SDS-PAGE (nicht-reduzierend)	2 ml Sammelgelpuffer, 2 ml 16 % (w/v) SDS, 4 ml Glycerin, 2 ml 0.2 % (w/v) Bromphenolblau, 50 mM Jodacetamid, pH 6,8
Probenpuffer Agarose-Gele	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 % (w/v) Glycerin, 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7.2
Sammelgelpuffer SDS-PAGE (5x Stammlösung)	0.5 M Tris, 0.4 % (w/v) SDS, pH 6.8
Trenngelpuffer SDS-PAGE (5x Stammlösung)	1.5 M Tris, 0.4 % (w/v) SDS, pH 8.8
WW Puffer TA	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5
WW Puffer TB	50 mM Tris, 500 mM NaCl, (1 mM EDTA), pH 8.0
WW Puffer HA	50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5
WW Puffer HB	50 mM Hepes, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
WW Puffer P-NMR	10 mM Natriumdihydrogenphosphat/ Dinatriumhydrogenphosphat, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 6.0

Bezeichnung	Zusammensetzung
WW Puffer P-FL	10 mM Natriumdihydrogenphosphat/ Dinatriumhydrogenphosphat, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.0
<i>Spot-Stripping</i> -Puffer NR	6 M GdnHCl, pH 4.5
WW Puffer PA	50 mM Natriumdihydrogenphosphat/ Dinatriumhydrogenphosphat, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 5.5-6.5
<i>Spot</i> -Regenerationspuffer A	6 M GdnHCl, 1% (w/v) SDS, 0.1% (v/v) Mercaptoethanol, pH 7.5
<i>Spot</i> -Regenerationspuffer B	10% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) Ethanol

## II.8. Nährmedien für die Kultivierung von *E.coli*

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7.5
LB-Amp	LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin
LB-Agar	LB-Medium + 15 g/l Agar-Agar
SOC-Medium	20 mM Glucose, 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0.5 g/l NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7.5
M9-Medium	M9-Puffer, Glucose (ggf. <sup>13</sup> C-markiert), Ammoniumchlorid-Lösung (ggf. <sup>15</sup> N-markiert), Magnesiumsulfat-Lösung, Calciumchlorid-Lösung Ampicillin (50 µg/ml), Spurenelemente-Lösung, H <sub>2</sub> O (bidest, autoklaviert)
M9-Puffer (10x Stammlösung)	59.2 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 30 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 5 g/l NaCl (autoklavieren)
Glucose (10x Stammlösung)	2 g Glucose, 100 ml H <sub>2</sub> O (autoklavieren)
Ammoniumchlorid (100x Stammlösung)	100 mg/ml NH <sub>4</sub> Cl (sterilfiltrieren)
Magnesiumsulfat (1000x Stammlösung)	5 g MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O, 20 ml H <sub>2</sub> O (sterilfiltrieren)
Calciumchlorid (1000x Stammlösung)	0.28 g CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, 20 ml H <sub>2</sub> O (sterilfiltrieren)
Spurenelemente (100x Stammlösung)	9 ml 10x SL4-Lösung, 10 ml 10x SL6-Lösung, 100 ml H <sub>2</sub> O (sterilfiltrieren)
SL4 (10x Stammlösung)	3.42 ml 0.5 M EDTA, 200 mg Fe(II)SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 90 ml H <sub>2</sub> O
SL6 (10x Stammlösung)	100 mg ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 39 mg MnCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 300 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 106 mg CoCl <sub>2</sub> 10 mg CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 20 mg NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O 30 mg NaMoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 1 l H <sub>2</sub> O

## II.9. Molekularbiologische Methoden

### II.9.1. Isolierung und Aufreinigung von DNA aus *E.coli*

Die Isolierung und Reinigung erfolgte mit Hilfe verschiedener Kits der Firma QIAGEN nach den Anwendungsvorschriften des Herstellers. Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Übernachtskulturen wurde das *QIAGEN Plasmid-Mini Kit* verwendet. Um DNA aus den Ansätzen von PCR-Reaktionen, Restriktionsspaltungen sowie Dephosphorylierungen zu reinigen, wurde das *QIAGEN Quick PCR Purification Kit* angewendet. Die Extraktion von DNA aus Agarose-Gelstücken wurde anhand des *QIAGEN Minelute Gel Extraction Kits* durchgeführt.

### II.9.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR erlaubt eine Amplifikation eines DNA-Fragmentes (Templat) über einen Bereich, der von zwei dem Templat komplementären Oligonukleotiden (*Primer*) flankiert wird. Durch Einsatz einer temperaturstabilen DNA-Polymerase lassen sich in einer zyklischen Abfolge von Aufschmelzen (Denaturierung) des Templats, Anlagerung (*Annealing*) der *Primer* und sukzessiver DNA-Polymerisation (Extension) auch sehr geringe DNA-Mengen hochspezifisch vervielfältigen. (Mullis et al., 1986) Die *Primer*-spezifische Temperatur des *Annealings* wurde anhand der Sequenz (Abschnitt II.5) mit dem Programm *Gene Runner* berechnet, die Reaktion wurde im Thermocycler durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte bei 95°C, initial für 5 min, darauffolgend jeweils 45 s pro Zyklus. Daran schloß sich die *Annealing*-Phase für 45 s bei der jeweils errechneten Temperatur an, gefolgt von der Extension durch die *Pfu*-DNA-Polymerase bei 72°C für eine Dauer, die von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments abhängig ist (2 kbp/min). Das anschließende Denaturieren der DNA beendete den Zyklus, der 25-30 mal durchlaufen wurde. Schließlich wurde die Reaktion mit einer finalen Extension von 5 Minuten beendet.

### II.9.3. Ortsgerichtete Mutagenese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl DNA-Fragmente als auch vollständige Plasmide mittels ortsgerechter Mutagenese modifiziert, wobei das *Quikchange*-Verfahren (Stratagene, La Jolla, USA) bzw. eine Variante der *Megaprimer*-Methode (Esser, 2000) angewandt wurde. Die Reaktion wurde unter Verwendung von *Pfu*-DNA-Polymerase analog zur klassischen PCR-Reaktion durchgeführt, unter Berücksichtigung der verlängerten Extensionszeit, die für die Amplifikation des gesamten Plasmids notwendig war. Die Transformation von elektrokompenten *E.coli* TOP10 mit der mutierten DNA erfolgte nach dem *QuikChange*-Protokoll unter Verwendung eines Elektroporationsgerätes. Die Selektion positiver Klone erfolgte sowohl durch DNA-Sequenzierung als auch Restriktionsanalyse.

### II.9.4. DNA-Sequenzierung

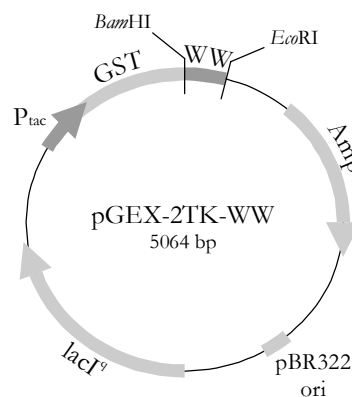
Zur Verifizierung der korrekten Nukleotidsequenz der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Fusionsproteine sowie deren abgeleiteten Varianten, wurde die DNA-Sequenzierung mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Aus Übernachtskulturen von *E.coli* TOP10 wurde zunächst die Plasmid-DNA isoliert, die das zu sequenzierende Fragment enthält. Unter Verwendung von spezifischen Sequenzieroligonukleotiden (Abschnitt II.5) sowie des *SequiTherm Excel II Long-Read DNA Sequencing Kits* wurde die Sequenzierreaktion nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Für die GST-Fusionsproteine wurden der Sequenzier-Primer 'Seq pGEX' verwendet. PCR-Produkte, die in den Vektor pCR-Blunt II TOPO kloniert worden waren, wurden mit den Primern 'Seq M13 forward' und 'Seq M13

reverse' sequenziert und die pET15b-Konstrukte (Polyprolin-GFP-Fusionen) mit den Primern 'Seq T7 Terminator' und 'Seq T7 Promoter'. Die Verwendung der letzteren beiden Primer-Paare erlauben eine Sequenzierung vom 3'- bzw. 5'-Ende des in den jeweiligen Vektor inserierten Fragmentes. Die Analyse der Sequenz wurde anhand eines Li-Cor DNA 4000 DNA-Sequenzierers durchgeführt und erlaubte eine Leseweite von 600-800 bp pro Ansatz.

### II.9.5. Generierung der GST-WW-Fusionskonstrukte

Die Vektoren pGEX-2T und pGEX-2TK (Amersham Biosciences) erlauben die rekombinante Expression von Proteinen in *E. coli* als lösliche N-terminale Fusion mit Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum*. GST weist eine spezifische Bindungsaffinität zu Glutathion (GSH) auf. Eine Affinitätschromatografie unter Verwendung einer Säule, an die GSH immobilisiert wurde, ermöglicht es, das Fusionsprotein aus dem bakteriellen Lysat schnell und effizient zu reinigen (Smith & Johnson, 1988). Die beiden verwendeten pGEX Vektoren verfügen dabei zusätzlich über eine Sequenz, die für eine Schnittstelle der Serin-Protease Thrombin kodiert, wodurch eine proteolytische Abspaltung des GST-Anteils vom Fusionsprotein möglich ist. Ferner unterscheidet sich pGEX-2TK von pGEX-2T durch das Vorhandensein einer Kinase-Erkennungssequenz, die eine radioaktive Markierung des GST-Fusionsproteins erlaubt, aber im Rahmen dieser Arbeit nicht von Bedeutung war. Konsequenz der Verwendung dieser Vektoren ist, daß nach der proteolytischen Spaltung durch Thrombin am N-Terminus des gewünschten Proteins 9 Aminosäurereste (im Fall von pGEX-2TK) bzw. zwei Aminosäuren (pGEX-2T) verbleiben (Abbildung 8).

Die Wildtyp-Nukleotidsequenz der FBP11-WW-Domäne 1 (WW-wt) wurde freundlicherweise von Mark Bedford (Harvard Medical School, Boston, USA) in Form des Plasmids pGEX-2TK-WW zur Verfügung gestellt. Dabei war das WW-Domänen-Fragment über die Restriktionsschnittstellen 5'-*Bam*HI und 3'-*Eco*RI des Vektors inkloniert.



**Abbildung 7:** Plasmidkarte des Expressionsvektors für GST-WW-Fusionsproteine pGEX-2T(K)

Die beiden Cystein-Varianten WW-D24C und WW-K35C der FBP11-WW1-Domäne wurden durch ortsgerichtete Mutagenese (*Quikchange*) dieses Plasmides (Abschnitt II.9.3) mit den Oligonukleotiden 'WW D24C *sense/antisense*' und 'WW K35C *sense/antisense*' generiert.

Im Laufe der Arbeit wurde die Aminosäuresequenz von WW-wt N-terminal um die vier Aminosäuren AKSM verlängert, wobei diese Insertion ebenfalls durch ortsgerichtete Mutagenese (*Quikchange*) des Plasmides pGEX-2TK-WWa erreicht wurde. Dabei wurden die Oligonukleotide 'WW AKSM *sense/antisense*' eingesetzt.

Das um die N-terminalen Kinase-Erkennungssequenz verkürzte Konstrukt 'WW- $\Delta k'$ ' wurde durch Transfer von 'WW-AKSM' in den Vektor pGEX-2T gewonnen. Die dazu verwendeten Methoden folgten etablierten Standardprotokollen der Molekularbiologie (Ausubel et al., 1994). Aus dem Vektor pGEX-2TK wurde durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI/*Eco*RI

das DNA-Fragment kodierend für 'WW-AKSM' isoliert und ebenfalls über die Schnittstellen *Bam*HI/*Eco*RI in den Vektor pGEX-2T inseriert. Abbildung 8 gibt eine Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Varianten der GST-Fusion von FBP11-WW1.

	GST	Thrombin	Kinase	FBP11-WW1	pGEX
		▼		13 . . . 17 . . 20 . . . . 25 . . . . 30 . . . . 35 . . . . 39 . . . . 44	
WW-wt:	. . .	SDLVPRGS	RRASVGS	---WTEHKSPDGRYYYYNTETKQSTWEKPDD	2TK
WW-AKSM:	. . .	SDLVPRGS	RRASVGS	AKSMWTEHKSPDGRYYYYNTETKQSTWEKPDD	2TK
WW- $\Delta$ kt:	. . .	SDLVPRGS	----	AKSMWTEHKSPDGRYYYYNTETKQSTWEKPDD	2T
WW-D24C:	. . .	SDLVPRGS	RRASVGS	---WTEHKSPCGRYYYYNTETKQSTWEKPDD	2TK
WW-K35C:	. . .	SDLVPRGS	RRASVGS	---WTEHKSPDGRYYYYNTETCQSTWEKPDD	2TK

**Abbildung 8:** Übersicht der in dieser Arbeit erstellten GST-Fusionskonstrukte von FBP11-WW1 basierend auf dem Plasmid pGEX-2TK. Zusätzlich zu den Sequenzen der WW-Varianten (blau unterlegt) dargestellt sind C-Terminus von GST (grau schattiert), die Thrombin-Erkennungssequenz (gelb unterlegt) mit Schnittstelle (rotes Dreieck) und die Kinase-Erkennungssequenz von pGEX-2TK (grün). Die konservierten Trp sind fett gedruckt, die eingeführten Cys rot markiert. Die jeweils verwendete Variante des pGEX-Vektors ist in der rechten Spalte angegeben. Nach proteolytischer Thrombinspaltung des GST-Fusionsproteins verbleiben (je nach Vektor) die Reste C-terminal der Thrombinschnittstelle an der isolierten WW-Domäne. Die Aminosäurereste GS unmittelbar vor der WW-Domäne resultieren aus der *Bam*HI-Schnittstelle des Vektors (Nummerierung der WW-Aminosäuren nach Macias et al., 1996).

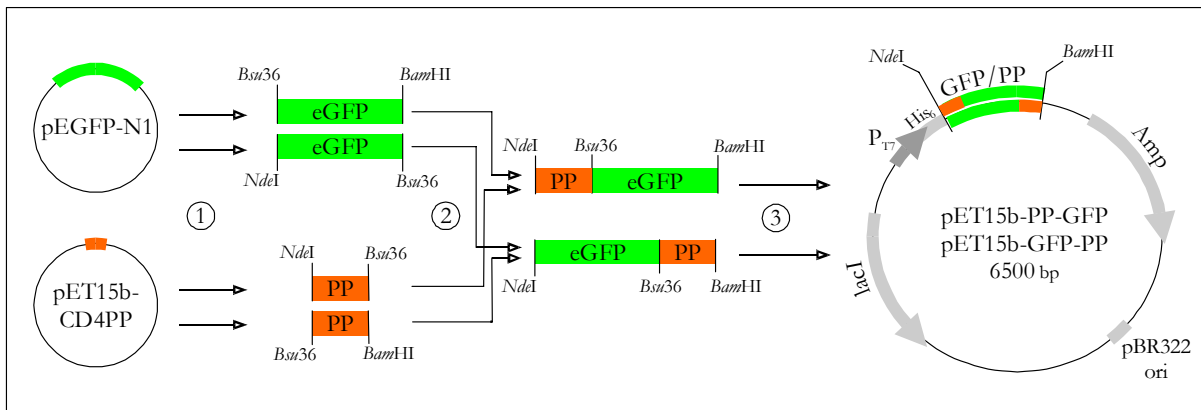
### II.9.6. Klonierung der Polyprolin-GFP-Fusionsproteine

Es wurden zunächst zwei Fusionskonstrukte bestehend aus dem Polyprolin-*tag* (PP) und GFP (im Speziellen: eGFP, *enhanced* GFP, eine artifiziell stabilisierte Variante des Wildtyp-GFP aus *Aequoria Victoria*) generiert: 'PP-GFP' mit N-terminalen Polyprolin-*tag* und 'GFP-PP' mit C-terminalen Polyprolin-*tag*. Sofern nicht anders angegeben, wurde bei der Durchführung den jeweiligen Hersteller-Vorgaben bzw. etablierten Standardprotokollen (Ref. Current Protocols) gefolgt.

Die isolierten Fragmente 'GFP' und 'PP' wurden zunächst mittels PCR aus den Plasmiden pEGFP-N1 (Clontech) bzw. pET15b-CD4PP (freundlicherweise von Christiane Jäger, Institut für Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle, zur Verfügung gestellt) amplifiziert und später über eine gleichzeitig eingeführte *Bsu*36-Schnittstelle fusioniert. Dazu wurden für das Konstrukt 'PP-GFP' die *Primer* 'PP-5-*Nde*I' und 'PP-3-*Bsu*36' sowie 'GFP-5-*Bsu*36' und 'GFP-3-*Bam*HI' eingesetzt. Analog erfolgten die Amplifikationen für das Konstrukt 'GFP-PP' mit den *Primern* 'GFP-5-*Nde*I' und 'GFP-3-*Bsu*36' sowie 'PP-5-*Bsu*36' und 'PP-3-*Bam*HI'. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden zunächst mit *Bsu*36 (16h bei 37°C) geschnitten, über die entstandenen Schnittstellen ligiert und das entstandene Fragment mittels PCR amplifiziert (verwendete *Primer*: 'PP-5-*Nde*I' und 'GFP-3-*Bam*HI' für PP-GFP, sowie 'GFP-5-*Nde*I' und 'PP-3-*Bam*HI' für das Konstrukt GFP-PP). Die entstandenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe des *pCR-Blunt II-TOPO Cloning Kit* in den Vektor pCR-Blunt-II-TOPO kloniert und sequenziert. Klone, die das gewünschte Fusionskonstrukt in korrekter Sequenz enthielten, wurden darauffolgend mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Bam*HI geschnitten. Das dabei entstehende DNA-Fragment wurde isoliert und gereinigt und über die genannten Schnittstellen in den Expressionsvektor pET15b (Novagen) inseriert. Dieser Vektor ermöglicht die bakterielle Überexpression des klonierten Proteins und resultiert außerdem in einer N-terminalen Fusion des jeweiligen Konstruktes mit einem Hexahistidin-*tag* (*His*<sub>6</sub>-*tag*). Anhand des *His*<sub>6</sub>-*tags* ist eine einfache und schnelle Affinitätsreinigung des Proteins an einer Nickel-Matrix (NiNTA-Säule) möglich.

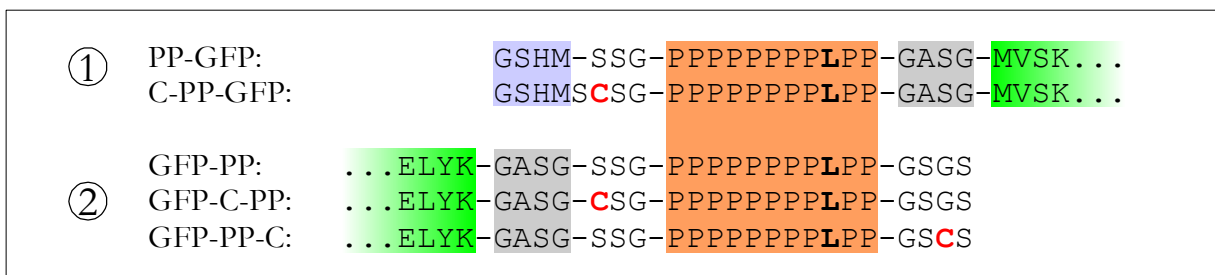


Weiterhin lässt sich der His<sub>6</sub>-tag durch proteolytische Spaltung mit Thrombin entfernen. Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 9 zusammengefasst:



**Abbildung 9:** Klonierung der Polyprolin-GFP-Konstrukte und Plasmidkarte des Vektors pET15b, in den die Nukleotidsequenz des jeweiligen Konstrukts inseriert wurde. Schritt (1) umfasste die PCR-Amplifikation der Nukleotidsequenzen von eGFP und Polyprolin-tag sowie deren anschließende Restriktionsspaltung durch *Bsu36*. In Schritt (2) erfolgte die N- bzw. C-terminale Fusion von Polyprolin-tag und eGFP durch Ligation und PCR-Amplifikation des Ligationsproduktes und Schritt (3) beinhaltet (die hier nicht gezeigte) Zwischenklonierung in den Vektor *pCR Blunt II-TOPO* zur DNA-Sequenzierung und nachfolgenden Umklonierung der Fragmente PP-GFP und GFP-PP über die Schnittstellen *NdeI/BamHI* in den Expressionsvektor pET15b.

Die so erhaltenen Fusionskonstrukte PP-GFP und GFP-PP wurden daraufhin der ortsgerichteten Mutagenese unterzogen, um jeweils das erforderliche Cystein einzuführen. Die Cysteine sollten jeweils N- oder C-terminal den Polyprolin-tag flankieren, separiert durch zwei Aminosäurereste (Gly-Ser), die als *linker* fungieren sollten. Daraus hätten ursprünglich vier Varianten resultieren sollen (zwei Cys-Varianten von PP-GFP und zwei von GFP-PP), jedoch verlief die Mutagenese für eine Variante von PP-GFP nicht erfolgreich, weshalb im folgenden nur drei Cys-Varianten angegeben werden. Das Konstrukt C-PP-GFP wurde mittels Variante A der ortsgerichteten Mutagenese (verwendete *Primer*: 'C-PP-GFP *sense/antisense*') erzeugt, die Konstrukte GFP-C-PP und GFP-PP-C anhand Variante B ortsgerichtet mutiert (*Primer*: 'GFP-C-PP *forward*'/'GFP-PP *reverse*' und respektive 'GFP-PP-C *forward*'/'GFP-PP *reverse*'). Die Aminosäuresequenzen der im Rahmen der Arbeit generierten Polyprolin-GFP-Fusionen ist in Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10:** Aminosäuresequenz-Abschnitte der generierten GFP-Konstrukte mit (1) N-terminaler und (2) C-terminaler Polyprolin-Fusion. Der Polyprolin-tag ist orange eingefärbt und zu GFP gehörende Aminosäuren grün unterlegt. Die *Bsu36*-Schnittstelle zwischen Prolin-tag und eGFP resultiert jeweils in den grau schattierten Sequenzen (G)ASG, die gleichzeitig als *linker* fungieren. Die blau unterlegten Aminosäuren GS bleiben von der proteolytischen Abspaltung des His<sub>6</sub>-tags durch Thrombin zurück, HM entspricht der *NdeI*-Schnittstelle am 5'-Ende des klonierten Fragments. Die eingeführten Cysteine sind rot markiert.

## II.10. Proteintechnologische Methoden

### II.10.1. Kultivierung von *E.coli* und rekombinante Proteinexpression

Die Anzucht von *E.coli* BL21(DE3) und rekombinante Expression erfolgte in 5-Liter-Erlenmeyerkolben (eingesetztes Volumen: 1,5 Liter) im Schüttelinkubator. Dazu wurden zunächst 20 ml LB-Medium (supplementiert mit Ampicillin als Antibiotikum) mit 50  $\mu$ l einer Glycerinkultur des jeweils verwendeten Stammes inokuliert und über Nacht bei 37°C angezogen. Diese Vorkultur wurde wiederum in LB-Amp-Medium 1:150 verdünnt und bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Bei Erreichen einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 wurde die rekombinante Expression des gewünschten Proteins durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert.

Die Expression der GST-WW-Fusionen erfolgte über eine Dauer von 7 h bei 37°C, die Polyprolin-GFP-Fusionsproteine wurden nach Induktion über einen Zeitraum von 20 h bei 30°C exprimiert.

### II.10.2. Kultivierung von *E.coli* zur Expression <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C-markierter Proteine

Bei der <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C-Markierung von Proteinen für die NMR-Spektroskopie wurde ein spezielles Minimalmedium (M9) zur Bakterienkultivierung verwendet, das <sup>15</sup>N-Ammoniumchlorid als einzige Stickstoffquelle sowie <sup>13</sup>C-Glucose als ausschließliche Kohlenstoffquelle beinhaltet. War lediglich eine <sup>15</sup>N-Markierung des Proteins von Interesse, wurde unmarkierte Glucose (<sup>12</sup>C) verwendet. Sämtliche essentiellen Mineralsalze und Spurenelemente mußten zusätzlich im Medium enthalten sein. Das Medium wurde dabei unmittelbar vor Inokulation der Hauptkultur aus den vorbereiteten autoklavierten bzw. steril-filtrierten Stammlösungen zubereitet. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte analog der üblichen Kultivierung (Abschnitt II.10.1) jedoch im M9-Medium. Entsprechend wurde damit M9-Medium der Hauptkultur (Schüttelkolben) beimpft, bei 37°C kultiviert und bei einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,6 und 0,8 mit 1 mM IPTG induziert. Die Expression von <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C-GST-WW erfolgte ebenfalls über 7 h bei 37°C.

### II.10.3. Zellernte, -aufschluß und Gewinnung des löslichen Proteinanteils

Die Ernte der Bakterienkulturen wurde mittels Zentrifugation bei 5000 x g (15 min, 4°C, Rotor: JLA 8.100, Zentrifuge Avanti) durchgeführt. Das sedimentierte Bakterienpellet wurde in dem jeweiligen Aufschlußpuffer resuspendiert (4 ml/g Zellen Feuchtgewicht) und in zwei Durchläufen durch Hochdruckdispersion aufgeschlossen (800-1000 bar, Micron LAB 40 Gaulin Hochdruck-Homogenisator). Anschließend wurden unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 48000 x g (1 h, 4°C, Zentrifuge Avanti) abgetrennt und der Überstand (Rohextrakt) mit den enthaltenen löslichen Proteinen isoliert.

### II.10.4. Glutathion-Affinitätschromatografie

Die Affinität von Glutathion-S-Transferase (GST) zu Glutathion (GSH) läßt sich für die chromatografische Reinigung von GST-Fusionsproteinen nutzen. Dabei nutzt man eine Matrix (Säule, hier: GSH-Sepharose 4B), an die GSH kovalent immobilisiert wurde und an die das GST-Fusionsprotein bindet. Nach Abtrennung der nicht-bindenden Bestandteile (*E.coli* Proteine) läßt sich das GST-Fusionsprotein mit löslichem GSH wieder von der Säule eluieren. Aufgrund der hohen Spezifität der Bindung von GSH an GST läßt sich das gewünschte Protein in einem Schritt bis zu einem hohen Reinheitsgrad (>90%) aus dem Rohextrakt isolieren (Simons & Vander Jagt, 1977; Smith & Johnson, 1988).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sämtliche Varianten der GST-WW-Fusion nach dieser Methode gereinigt. Der Zellaufschluß wurde dazu in 'GST Auftragungs-/Waschpuffer' durchgeführt. Mit Hilfe einer FPLC-Anlage (Äkta Explorer 100) wurden auf eine equilibrierte Säule, befüllt mit GSH-Sepharose-4B (Säulenvolumen 20 ml, Kapazität: 160 mg GST-Fusionsprotein lt. Hersteller), bis zu 150 ml Rohextrakt aufgetragen (Flußrate 0,5 ml/min). Nachfolgend wurde zuerst mit 5 Säulenvolumina 'GST Auftragungs-/Waschpuffer', dann mit gleichem Volumen 'GST Elutionspuffer' (zunächst noch ohne Zusatz von GSH) gewaschen. Die Elution erfolgte über drei Säulenvolumina mit 'GST-Elutionspuffer' (10 mM GSH enthaltend). Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 5-10°C (Kühlraum). Die Regeneration des Säulenmaterials erfolgte nach Vorgaben des Herstellers.

### II.10.5. Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC)

Die N- oder C-terminale Fusion eines Hexahistidin-*tags* an das rekombinante Protein ermöglicht die Affinitätsreinigung basierend auf der Chelatisierung von immobilisierten Ni<sup>2+</sup>-Ionen des Ni-NTA-Säulenmaterials durch die Imidazoliumgruppen der His<sub>6</sub>-*tags*. Durch Zugabe von löslichem Imidazol läßt sich das auf diese Weise immobilisierte und gereinigte Protein wieder eluieren.

Für diese Arbeit wurde die IMAC-Strategie zur Reinigung der Polyprolin-eGFP-Varianten gewählt. Dazu erfolgte der Zellaufschluß (Abschnitt II.10.3) in 'Ni-NTA Auftragungspuffer'. Mittels einer FPLC-Anlage (Äkta Explorer 100) wurden 50 ml Rohextrakt auf eine equilibrierte Ni-NTA-Säule (NiNTA His Bind Resin, Säulenvolumen 20 ml, Flußrate 0,5 ml/min) aufgetragen und mit 5 Säulenvolumina 'Ni-NTA Auftragungspuffer' gewaschen. Durch Gradientenelution von 0 bis 100% 'Ni-NTA Elutionspuffer' über 5 Säulenvolumen wurde das gereinigte Protein gewonnen und das in den Fraktionen enthaltene Imidazol im Zug der nachfolgenden Gelfiltration (Abschnitt II.10.8) abgetrennt. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten bei 5°-10°C.

### II.10.6. Proteolytische Spaltung von Fusionsproteinen durch Thrombin

Die in dieser Arbeit hergestellten Fusionsproteine von GST und den WW-Domänen-Varianten sowie der eGFP-Konstrukte mit N-terminalem His<sub>6</sub>-*tag* verfügten selbst über keine intrinsische Thrombin-Schnittstelle, erhielten aber aufgrund der verwendeten Expressionsvektoren pGEX und pET15b eine Thrombin-Erkennungssequenz (LVPRGS), die eine proteolytische Abspaltung des GST- bzw. His-*tags* ermöglichten.

Dazu wurden zunächst die Fraktionen der gereinigten Fusionsproteine vereinigt und mittels Zentrifugenkonzentratoren (Amicon-Ultra) aufkonzentriert (GST-WW: bis zu 60 mg/ml, GFP-Varianten: bis zu 40 mg/ml). Die proteolytische Spaltung von GST-WW wurde in 'GST-Elutionspuffer' (in Anwesenheit von 10 mM GSH) und im Fall der His<sub>6</sub>-GFP-Fusionen in 'Ni-NTA Elutionspuffer' (in Gegenwart von Imidazol) durchgeführt. Dabei wurde eine Thrombinkonzentration von 2 U/ml (lt. NIH-Unit-Definition, Sigma) im Ansatz verwendet, die Proteolyse erfolgte über eine Zeitdauer von 16 h bei 37°C und wurde durch Zusatz von 1 mM PMSF abgestoppt. Die zugesetzten Substanzen Thrombin und PMSF wurden im Rahmen des nachfolgenden Chromatografieschrittes abgetrennt (RP-HPLC bzw. Gelfiltration).

### II.10.7. Analytische und präparative *Reversed-Phase*-HPLC

Die Methode der *Reversed-Phase*-HPLC (RP-HPLC) wurde sowohl zu analytischen als auch präparativen Zwecken eingesetzt. Als mobile Phase wurde dabei ein Acetonitril/Wasser-System in Gegenwart von 0,05% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Da sowohl Acetonitril, der niedrige pH-Wert der mobilen Phase (pH 2) als auch die hydrophobe Matrix der verwendeten stationären Phase (Säule) auf Proteine stark denaturierend wirkt, muß berücksichtigt werden, daß für präparative Zwecke nach einer RP-HPLC Reinigung die Proteine zunächst im entfalteten Zustand vorliegen. Erst nach Entfernung des Eluentensystems (z.B. durch Lyophilisation) ist

gegebenenfalls eine Rückfaltung in den nativen Zustand möglich (vorausgesetzt das Protein aggregiert dabei nicht). RP-HPLC als präparative Reinigung ist daher zumeist nur bei Peptiden und sehr kleinen Proteinen anwendbar.

Analytische und präparative RP-HPLC wurden im Rahmen dieser Arbeit an einer Dionex HPLC-Anlage unter Verwendung verschiedener Säulen durchgeführt, die in Tabelle 4 aufgeführt sind. Die Detektion erfolgte für Peptide bei 225 nm, für Proteine, die aromatische Aminosäuren enthielten, bei 280 nm.

**Tabelle 4:** Säulenparameter der verwendeten RP-HPLC-Säulen

Säulenbezeichnung	Säulenparameter	Säulen- volumen
ProteinRP	250 mm x 3 mm, 5 µM	1,7 ml
Licrospher WP 300 RP-18	250 mm x 10 mm, 5 µM	19,6 ml
Source15 RPC	75 mm x 7,5 mm	3,6 ml

Es wurde ein Eluentensystem basierend auf Wasser und Acetonitril verwendet, dem 0,05 % (v/v) TFA zugesetzt wurde. Die für die jeweiligen Trennproblematiken eingesetzten Säulen sind mit den dafür optimierten Parametern der linearen Gradientenelution in Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5:** Kenngrößen der in dieser Arbeit verwendeten RP-HPLC-Trennverfahren

Anwendung	Säule	Flußrate (ml/min)	Gradient <sup>1</sup>	Gradienten- länge
Reinigung isolierter WW-Domänen	Source15 RPC	2,5	0-25%	20 min
Reinigung biotinylierter WW-Domänen	Source15 RPC	2,5	10-35%	30 min
Reinigung synthetischer Polyprolin-Peptide	Licrospher WP 300 RP-18	4,0	15-45%	20 min
Kopplungsanalysen der isolierten WW-Domäne mit Peptidliganden	ProteinRP	0,5	10-35%	30 min
Kopplungsanalysen von GST-WW mit PP-GFP	ProteinRP	0,5	35-45%	30 min
Probenentsalzung für die Massenspektrometrie	ProteinRP	0,5	0-65%	30 min

<sup>1</sup> Prozentangabe des Acetonitril-Anteils

### II.10.8. Analytische und präparative Gelfiltrationschromatografie

Mit Hilfe der analytischen Gelfiltration wurde die Kopplung von GST-WW-K35C und C-PP-GFP anhand des Molekulargewichts der dabei auftretenden Spezies qualitativ und quantitativ untersucht. Dazu wurde eine 'TSKGel G3000SW' HPLC-Gelfiltrationssäule (Porengröße 10 µM, Säulendimensionen: 600 mm x 7,5 mm, Säulenvolumen: 26,5 ml) eingesetzt, die in 'WW Puffer TA' an einer 'Dionex' HPLC-Anlage betrieben wurde (Flußrate: 0,5 ml/min). Dazu wurden bis zu 100 µl Probenvolumen aufgetragen und isokratisch über 1,5 Säulenvolumina eluiert. Die Detektion erfolgte bei 280 nm (aromatische Aminosäuren) und ggf. bei 490 nm (eGFP-Absorption). Geringe Mengen der mit dieser Säule aufgetrennten Spezies konnten für weitere Analysen (SDS-PAGE, Massenspektrometrie) präparativ isoliert werden.

Durch präparative Gelfiltration anhand einer 'Superdex S-75'-Säule (Säulenvolumen: 320 ml, Säulendimensionen 650 mm x 25 mm), betrieben an einer FPLC-Anlage (Äkta Explorer 100, Flußrate 1 ml/min), wurde ein zusätzlicher Schritt bei der Reinigung der GFP-Variante C-PP-GFP realisiert. Dabei wurde sowohl der proteolytisch abgespaltene His<sub>6</sub>-tag, Thrombin, DTT als auch das verbliebene Imidazol abgetrennt. Es wurde ein Probenvolumen von 1,1 ml auf die äquilibrierte Säule aufgetragen, über 1,1 Säulenvolumina isokratisch eluiert und fraktioniert.

### II.10.9. Lyophilisation

Die Lyophilisation der Peptide und Proteine (isolierte WW-Domäne) wurde in dieser Arbeit jeweils im Anschluß an die *Reversed Phase*-HPLC durchgeführt, um einerseits Acetonitril und TFA abzutrennen, die Proben zu konzentrieren und diese andererseits in einen unproblematisch lagerbaren Zustand (festes Pulver) zu überführen. Aus den Fraktionen der RP-HPLC wurde zunächst das flüchtige Acetonitril evaporiert (2 ml Aliquots unter normaler Atmosphäre inkubiert bei 40°C für >10 h) und dann im verbliebenen Lösungsmittel (TFA/Wasser) bei -80°C eingefroren und in einer Gefriertrocknungsanlage bei einer Arbeitstemperatur von 25°C lyophilisiert. Das erhaltene Lyophilisat konnte dann, je nach Anwendung, in einem entsprechenden Puffer rekonstituiert werden.

### II.10.10. Konzentrierung von Proteinlösungen

Mit Hilfe von Zentrifugationskonzentratoren (Amicon-Ultra 15, MWCO: 5 kDa) wurden Proteinlösungen von GST-WW und Polyprolin-GFP-Varianten durch Zentrifugation (Beckman, Rotor JS 4.3, 3500 x g) bis zu einer Proteinkonzentration von 40-60 mg/ml aufkonzentriert. Insbesondere nach Gelfiltrationsschritten und vor der proteolytischen Thrombinspaltung von Fusionsproteinen wurde diese Methode angewendet. Die Proteinkonzentration wurde durch UV/VIS-Spektroskopie ermittelt (Abschnitt II.12.1).

### II.10.11. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE erlaubt die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in denaturierter Form in einem SDS-Polyacrylamidgel anhand des Molekulargewichtes (Laemmli, 1970). Durch das im Gel und Probenpuffer enthaltene SDS, das mit einer bestimmten Stöchiometrie an Proteine bindet, werden die Proteine denaturiert und erhalten eine negative Nettoladung. Man unterscheidet dabei zwischen nicht-reduzierender und reduzierender SDS-PAGE, wobei in letzterer Methode ein Reduktionsmittel im Probenpuffer vorhanden ist, so daß Disulfidbrücken vollständig reduziert werden.

In dieser Arbeit wurden Vertikalgele (8 cm x 10 cm x 0,75 mm) eingesetzt, die aus einem 15% Trenngel, überschichtet von einem 6% Sammelgel, bestanden. Die Prozentangabe bezieht sich dabei auf den Polyacrylamid-Anteil. Die Proben wurden mit reduzierendem bzw. nicht-reduzierendem SDS-Probenpuffer versehen und im Fall der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen 5 min bei 95°C erhitzt. Proben, die unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt werden sollten, wurden zunächst mit 50 mM Jodacetamid bei pH 8,5 versetzt, wodurch freie Thiolgruppen irreversibel carboxyamidomethyliert werden und damit nicht mehr reduzierend wirken können. Zur Denaturierung wurde schließlich nicht-reduzierender SDS-Probenpuffer zugesetzt, die Proben jedoch nicht erhitzt. Zu Referenzzwecken wurde der 'LMW Protein-Molekulargewichtsstandard' mitgeführt. Die Elektrophorese unter Verwendung des SDS-Laufpuffers erfolgte bei 35 mA pro Gel für 45 bis 70 min. Anschließend wurden die Gele mit PAGE-Fixierer (15 min), PAGE-Färber (2 h) und PAGE-Entfärber (24 h) behandelt, um die Banden der aufgetrennten Proteine zu visualisieren.

## II.11. Peptidchemische Methoden & *Spot*-Membran-Techniken

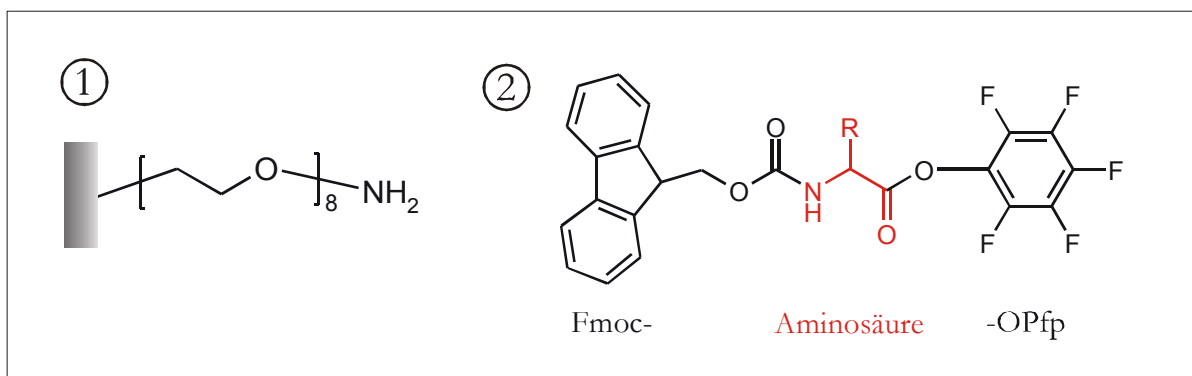
### II.11.1. Festphasensynthese und Reinigung löslicher Peptide

Die in Abschnitt II.6. aufgeführten Peptide wurden mittels automatischer Festphasen-Peptidsynthese (Merrifield, 1986) hergestellt, unter Anwendung der standardisierten FMOC-Schutzgruppenstrategie für  $\alpha$ -Aminogruppen sowie *tert*-Butyl- und *tert*-Butylthio-Schutzgruppen für die Serin- bzw. Cystein-Seitenketten. Die Synthesen wurden freundlicherweise von Dirk Wildemann (Arbeitsgruppe Dr. Frank Bordusa, Max-Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) bzw. Dr. Sven Rothemund (IZKF Leipzig) durchgeführt. In einigen Fällen wurden die Peptide in gereinigter, lyophilisierter Form erhalten, andere wurden dagegen selbst aufgereinigt.

Letzteres erforderte zunächst die Abspaltung der Syntheseprodukte von der Festphase (Chlortritylharz), entweder durch 100% TFA (1 h, 25°C) oder 25% HFIP (v/v) in Dichlormethan (30 min, 25°C), wobei nur bei der Abspaltung durch TFA, die *tert*-Butyl-Schutzgruppen von Serin-Seitenketten entfernt werden. Peptide, die kein Serin enthielten, wurden mittels HFIP vom Harz abgespalten und das HFIP/Dichlormethan-Gemisch durch Evaporation abgezogen. Das TFA aus der Spaltung wurde ebenfalls durch Vakuum-Evaporation entfernt und die Peptide mit kaltem Diethylether gefällt (Volumenverhältnis Ether:Peptidlösung 30:1, 4°C, 16 h) und in DMF wieder resuspendiert. Die *tert*-Butylthio-Schutzgruppe der Cysteine wurde im weiteren Verlauf reaktiv entfernt. Die in DMF gelösten, abgespaltenen Peptide wurden 1:10 in Ammoniumbicarbonatpuffer verdünnt, mit 100 mM DTT versetzt und für 16 h bei 25°C inkubiert. Darauf folgte die Reinigung durch präparative RP-HPLC (Abschnitt II.10.7.) und Lyophilisation (Abschnitt II.10.9). Die Identität der Peptide wurde durch Massenspektrometrie verifiziert. Die Ausbeuten waren sehr unterschiedlich und lieferten je nach Synthese- und Reinigungseffizienz zwischen 2 und 50 mg gereinigtes Peptid. Die Konzentrationsbestimmung der Peptide erfolgte entweder gravimetrisch oder mittels Peakintegration einer kalibrierten RP-HPLC-Analyse.

### II.11.2. Herstellung membrangebundener Peptidbibliotheken (*Spot*-Synthese)

Die *Spot*-Synthese stellt eine besondere Form der Peptid-Festphasensynthese (Abschnitt II.11.1.) dar, bei der eine Vielzahl von Peptiden auf einer derivatisierten Cellulose-Membran parallel generiert werden können (Frank, 1992; Kramer et al., 1993). Der Aufbau erfolgt ebenfalls schrittweise vom C- zum N-Terminus. Die verschiedenen Peptide werden jedoch gleichzeitig auf einer Cellulose-Membran aufgebaut, wodurch man eine membrangebundene Peptidbibliothek erhält. Die Applikation der jeweils zu koppelnden Aminosäuren erfolgt in Form von sogenannten *spots*, die eine räumliche Trennung der Peptide auf der Membran bewirken. Als Festphase wurde eine Amino-PEG-Cellulose-Membran eingesetzt, die - über einen Polyethylenglykol-*spacer* getrennt - freie Aminogruppen ( $400 \text{ nmol/cm}^2$ ) aufwies. Als Bausteine für die Peptidsynthese wurden N $^{\alpha}$ -geschützte Aminosäurederivate in Form ihrer Pentafluorphenylester (OPfp) verwendet (Abbildung 11). Diese stellen eine Carboxy-aktivierte Form der Aminosäuren dar, die eine Umsetzung mit freien Aminogruppen sehr effizient gestalten. Eine Reaktion mit der  $\alpha$ -Aminogruppe der zu koppelnden Aminosäure wurde dabei durch die Fmoc-Schutzgruppe unterbunden, die durch Piperidin abspaltbar ist. Als erste Aminosäure wurde stets  $\beta$ -Alanin gesetzt, die gleichzeitig das *Spot*-Raster auf der Membran definierte. Cystein wurde in Form des seitenkettengeschützten Fmoc-(S-Trityl)-Cystein-OPfp eingesetzt.



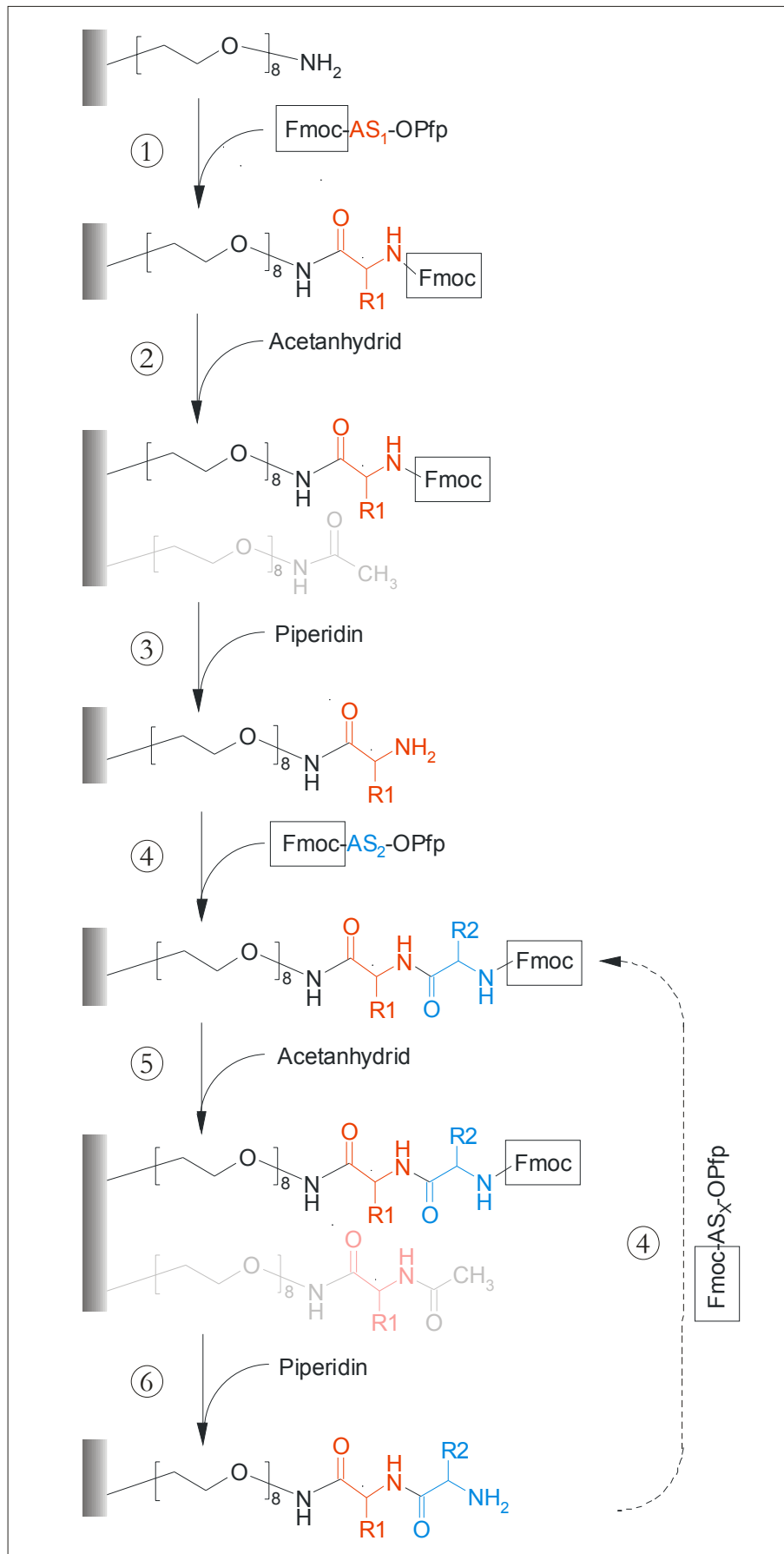
**Abbildung 11:** Die zur SPOT-Synthese verwendete Cellulosemembran mit PEG-*spacer* und freien Aminogruppen (1) und die Carboxy-aktivierten Aminosäurederivate (2) in Form von Pentafluorphenylestern (OPfp). Die  $\alpha$ -Aminogruppe ist durch die Fmoc-Schutzgruppe blockiert und damit nicht reaktiv. Sie läßt sich selektiv durch Piperidin abspalten. Die Aminosäurekomponente ist rot markiert.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten membrangebundenen Peptidbibliotheken wurden halbautomatisch durch Benutzung des 'SPOT Peptidsynthesizers APS222' hergestellt, der freundlicherweise von Dr. Frank Bordusa (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) zur Verfügung gestellt wurde (Membran-Format: 140 x 110 mm, 17 x 25 *spots*). Die Waschprozeduren wurden stets manuell durchgeführt. In Tabelle 6/Abbildung 12 wird das Protokoll der *Spot*-Synthese zusammengefasst.

**Tabelle 6:** Protokoll der *Spot*-Synthese (modifiziert nach Kramer & Schneider-Mergener, 1998)

Schritt <sup>1</sup>	Beschreibung	Durchführung
1	Definition des <i>Spot</i> -Rasters durch Aufbringen der ersten Aminosäure	0,2 $\mu$ l 0,3 M Fmoc- $\beta$ -Ala-OPfp in DMF, 3 x im Abstand von 5 min
	Entfernung nichtumgesetzter Reaktanden	Membran 3 x 3 min in DMF waschen
2	Acetylierung der verbliebenen freien Aminogruppen	5% (v/v) Acetanhydrid in DMF, 2 Tropfen N-Ethyl-diisopropylamin zugeben, 1 h
	Acetanhydrid entfernen	Membran 2 x 3 min in DMF waschen
3	Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe	20% (v/v) Piperidin in DMF, 1 min 20% (v/v) Piperidin in DMF, 20 min
	Entfernung des Piperidins/Fmoc	Membran 5 x 3 min in DMF waschen
	Membran trocknen	Membran 2 x 3 min in Methanol waschen, an der Luft trocknen
4	Aufbringen der zweiten Aminosäure	0,3 $\mu$ l Fmoc-AS-OPfp in DMF, 3 x im Abstand von 5 min
	Entfernung nichtumgesetzter Reaktanden	Membran 3 x 3 min in DMF waschen
5	Acetylierung der verbliebenen freien Aminogruppen (Terminierung unvollständiger Peptidvarianten)	5% (v/v) Acetanhydrid in DMF, 2 Tropfen N-Ethyl-diisopropylamin zugeben, 1 h
	Acetanhydrid entfernen	Membran 2 x 3 min in DMF waschen
6	Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe	20% (v/v) Piperidin in DMF, 1 min 20% (v/v) Piperidin in DMF, 20 min
	Entfernung des Piperidins/Fmoc	Membran 5 x 3 min in DMF waschen
	Membran trocknen	Membran 2 x 3 min in Methanol waschen, an der Luft trocknen
Wiederholung ab Schritt 4 mit den darauffolgenden Aminosäuren		

<sup>1</sup> Nummerierung lt. Abbildung 12



**Abbildung 12:** Schema des schrittweisen Aufbaus von membrangebundenen Peptidbibliotheken durch *Spot-Synthese* (Erklärungen im Text).



Die verwendeten Pentafluorphenylester der Fmoc-Aminosäuren wurden als 0,3 M Stammlösung in absolutem DMF vorbereitet. Das Aufbringen der Aminosäuren (*Spotting*) erfolgte mit zweifacher Wiederholung im Abstand von jeweils 5 Minuten auf die trockene Membran. Die Synthese fand bei Raumtemperatur statt. Nichtumgesetzte Reaktanden der Synthese wurden nach jedem Schritt durch Waschen der Membran in DMF entfernt. Freie Aminogruppen, die ggf. nicht mit den aktivierten Aminosäuren reagiert hatten, wurden acetyliert und terminierten an dieser Stelle die Peptidsynthese, um den Aufbau von falschen Sequenzen zu verhindern.

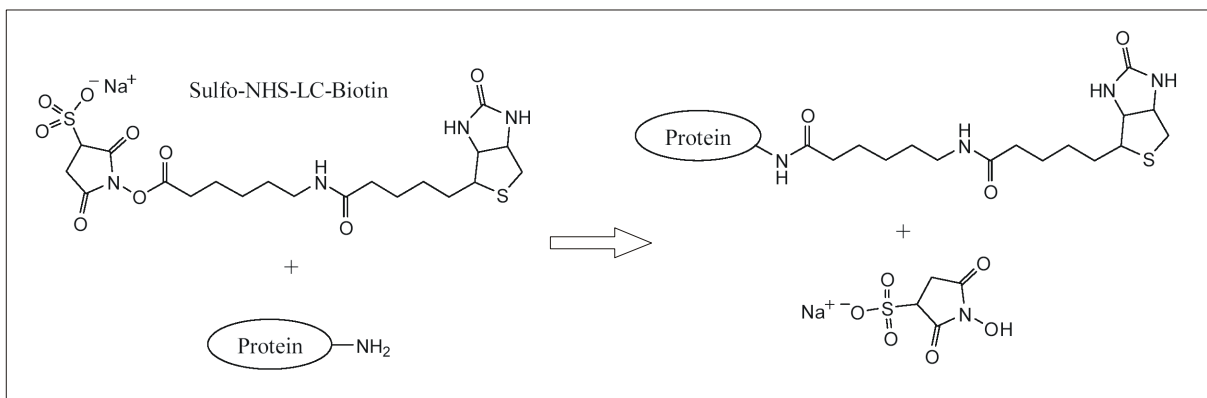
Nach der Kopplung der letzten Aminosäure, wurde die S-Trityl-Schutzgruppe der Cystein-Seitenkette entfernt. Dazu wurde die Membran 3 x 3 Minuten in Dichlormethan gewaschen und für 16 h bei 4°C in 50% (v/v) Dichlormethan/TFA (unter Zugabe von 2 Tropfen Wasser) inkubiert. Nach der Abspaltung wurde die Membran erneut 3 x 3 min in Dichlormethan, 2 x 3 min in DMF und schließlich in Methanol gespült und getrocknet. In diesem Zustand konnten diese bei -20°C gelagert werden.

Zur optionalen visuellen Überprüfung der Fmoc-Abspaltung sowie Aminosäurekopplungen ließen sich die membrangebundenen Peptide mit einer 1,5% (w/v) Bromphenolblau-Lösung in DMF anfärben. Die dabei auftretende Blaufärbung der *spots* resultiert aus dem Vorhandensein freier Aminogruppen (nach der Fmoc-Abspaltung) bzw. die ausbleibende Färbung nach der Kopplung von Fmoc-geschützten Aminosäuren signalisiert einen vollständigen Umsatz bei dieser Reaktion. Die Entfernung des nicht-kovalent gebundenen Farbstoffes erfolgte durch wiederholtes Waschen in DMF bis zur vollständigen Entfärbung.

### II.11.3. N-terminale Biotinylierung der WW-Domäne

Die Markierung von Peptiden und Proteinen mit Biotin erlaubt eine spezifische Detektion von biotinylierten Molekülen basierend auf der hohen Affinität von Biotin zu Avidin bzw. Streptavidin unter Verwendung geeigneter Streptavidin-Enzym-Konjugate (Abschnitt II.11.4).

Die hier vorgestellten biotinylierten Varianten von FBP11-WW1 wurden durch chemische Modifikation der N-terminalen Aminogruppe der gereinigten WW-Domänenvarianten mit 'EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin' (Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoat, NHS-Biotin) erzeugt.



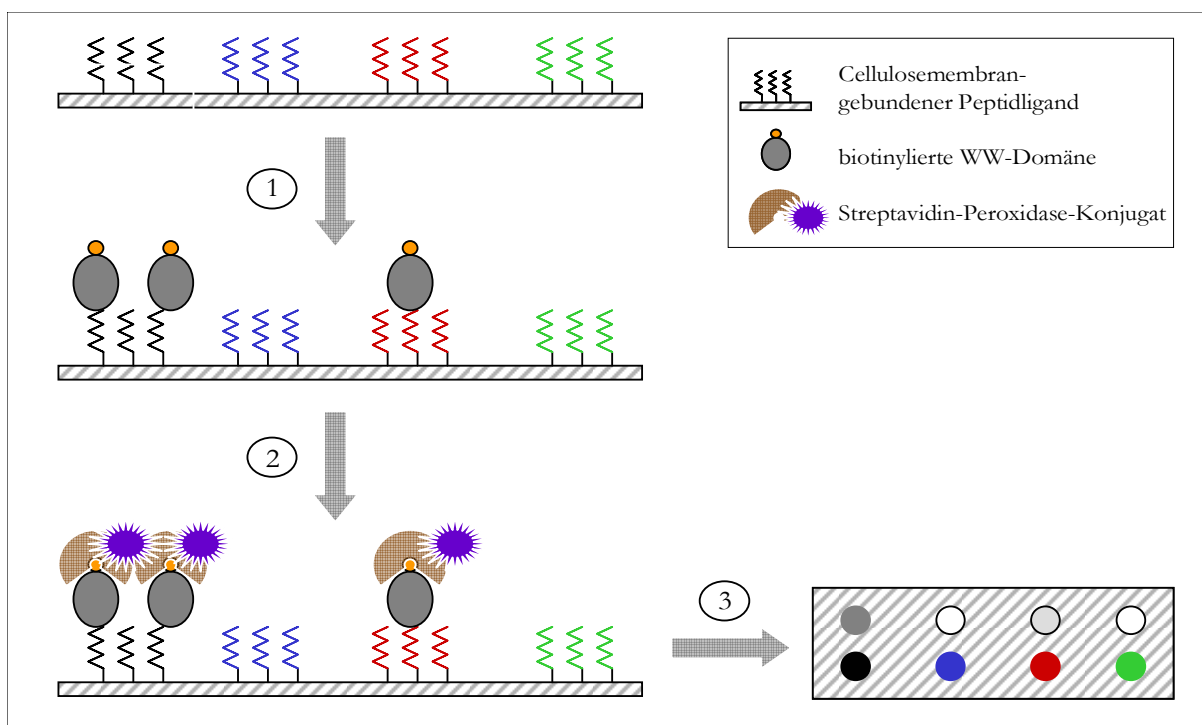
**Abbildung 13:** Biotinylierung von primären Aminogruppen durch NHS-Biotin. Dabei wird der Sulfo-NHS-Ester durch das primäre Amin nucleophil angegriffen wobei Sulfo-N-hydroxysuccinimid als Nebenprodukt frei wird. In Peptiden und Proteinen wird (je nach pH-Wert) hauptsächlich die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin sowie die N-terminale  $\alpha$ -Aminogruppe modifiziert. (aus: Savage et al., 1992)

NHS-Biotin stellt einen wasserlöslichen Aktivester des Biotins dar und reagiert vorwiegend mit zugänglichen, primären Aminogruppen in deprotonierter Form. Die Reaktivität von primären Aminogruppen in Proteinen ist daher direkt von ihrem pK<sub>a</sub>-Wert abhängig, der für freie  $\alpha$ -Aminogruppen im Bereich von 9-10 liegt, für die  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysin jedoch einen höheren Wert aufweist ( $\sim 10.3$ ; Harlow & Lane, 1988). Wird die Biotinylierungsreaktion bei

einem deutlich niedrigerem pH-Wert als den  $pK_a$ -Werten der Seitenketten-Aminogruppen durchgeführt, so läßt sich eine Biotinylierung bevorzugt am N-Terminus des Proteins realisieren. Zusätzlich wird die konkurrierende Hydrolyse des Esters durch das wässrige Lösungsmittel stark verlangsamt. Dazu wurde eine 500  $\mu\text{M}$  Lösung der jeweiligen isolierten WW-Domäne in Citratpuffer (pH 5,2) mit einem zehnfach molaren Überschuß von NHS-Biotin umgesetzt (2 h, 25°C) und die Reaktion anschließend durch Ansäuerung auf pH 4 (TFA) abgestoppt. Anhand der präparativen RP-HPLC mit einer SOURCE15-RPC-Säule und einem Gradienten von 10-35% Acetonitril (Steigung des Gradienten: 0,85%/min, Flußrate: 2,5 ml/min) konnte die einfach biotinylierte WW-Domäne von Fraktionen mehrfach biotinylierter Spezies abgetrennt werden. Die isolierte Fraktion wurde lyophilisiert und die korrekte Masse mittels Massenspektrometrie verifiziert.

#### II.11.4. Bindungsanalysen unter Verwendung membrangebundener Peptidbibliotheken

Die Verfügbarkeit von Peptidbibliotheken auf Cellulosemembranen erlauben die Bindungsanalyse eines Moleküls mit einer Vielzahl von Liganden gleichzeitig in einem parallelen Ansatz. Dazu ist es nötig, das bindende Molekül (hier: die WW-Domänen-Varianten) auf der Membran detektieren zu können (Frank, 1992; Kramer & Schneider-Mergener, 1998). In dieser Arbeit wurde dazu die N-terminale Biotin-Markierung der WW-Domäne (Abschnitt II.11.3.) gewählt, die eine Detektion des Biotins mit Hilfe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats ermöglicht. Basierend auf der Affinität von Biotin zu Streptavidin und der daran konjugierten Peroxidase, ließ sich die Bindung an bestimmte Liganden durch Umsatz eines geeigneten Peroxidasesubstrates (ECL), infolgedessen Chemilumineszenz auftritt, die auf einem lichtempfindlichen Film detektierbar ist (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Schema des Detektionsprinzips bei der parallelen Bindungsanalyse von WW-Domänen mit immobilisierten Peptidliganden (*Spots*, verschiedenfarbig dargestellt). Die biotinylierte WW-Domäne bindet an geeignete Liganden auf der Membran (**1**), je nach Ligand können verschiedene Affinitäten auftreten (z.B. schwarz mit höherer Affinität als rot). Die gebundenen WW-Domänen-Moleküle tragen die Biotin-Markierung, die von einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat erkannt wird (**2**). Zugabe des Peroxidase-Substrats, bei dessen Umsatz Chemilumineszenz auftritt, führt zu unterschiedlich starker Schwärzung eines lichtempfindlichen Films (**3**).

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsanalysen von WW-Domänen-Varianten an Bibliotheken von prolinreichen Peptiden wurde ein Protokoll etabliert, das in Tabelle 7 zusammengefaßt ist.

**Tabelle 7:** Protokoll der Bindungsanalyse auf *Spot*-Membranen (modifiziert nach Kramer & Schneider-Mergener, 1998). Die Inkubationsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, in einem Volumen von 5 ml des jeweiligen Puffers durchgeführt.

Schritt	Beschreibung	Durchführung
1	Membran equilibrieren	Membran 1 x in Methanol waschen, 10 min in 'WW-Puffer TA' inkubieren (25°C)
2	Membran blockieren	Membran 1h in Blockierungsreagenz inkubieren (25°C)
3	Membran waschen	Membran in 'WW-Puffer TB' waschen, 2 x 10 s
4	Bindung der WW-Domäne	Inkubation mit 1 µM Lösung der jeweiligen WW-Domäne in 'WW-Puffer TB', 15 h (5°C)
5	Entfernung ungebundener WW-Domäne	Membran in 'WW-Puffer TB' waschen, 3 x 10 min (25°C)
6	Membran blockieren	Membran 1h in Blockierungsreagenz inkubieren (25°C)
7	Bindung des Streptavidin-Peroxidase-Konjugates	Inkubation mit 1:3000-Verdünnung des Konjugats, 1h bei 25°C
8	Entfernung ungebundenen Konjugates	Membran mit 'WW-Puffer TB' waschen, 3 x 10 min
9	Detektion der Chemilumineszenz	Membran in 2 ml ECL-Substratlösung inkubieren (1 min bei 25°C), Belichtung des Films: 15 s bis 1 min

Die Entfernung der nicht-kovalent gebundenen WW-Domänen-Spezies erfolgte durch Inkubation der Membranen für 16 h in '*Spot*-Stripping-Puffer NR' bei 25°C. Danach erfolgte eine erneute Detektion der verbliebenen biotinylierten Molekülen wie bereits in Tabelle 7 beschrieben. Da die *Spot*-Membranen teilweise wiederverwendet werden konnten, wurden sie unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen regeneriert, um auch intermolekulare Disulfidbrücken zwischen Liganden und WW-Domäne aufzuheben. Dazu wurden sie für eine Dauer von 16 h bei 25°C in '*Spot*-Regenerationspuffer A', 1h bei 25°C in '*Spot*-Regenerationspuffer B' und abschließend in Methanol gewaschen und getrocknet.

## II.12. Biophysikalische Methoden & Strukturaufklärung

### II.12.1. Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV/VIS-Spektroskopie

Konzentrationsbestimmungen gereinigter Proteine in Lösung wurden mittels UV-Absorptionsspektroskopie an einem 'UV/VIS-Spektrophotometer DU-640' durchgeführt. Dem Gesetz von Lambert-Beer zufolge kann aus der Extinktion  $E$  bei einer Wellenlänge von 280 nm, dem molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{280}$  (in  $M^{-1}cm^{-1}$ ) und der Schichtdicke  $d$  (in cm) der verwendeten Küvette, die Konzentration  $c$  (in M) der Proteinlösung ermittelt werden:

$$E_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d \quad (1)$$

Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  eines Proteins lässt sich dabei aus der Summe der mit den spezifischen molaren Extinktionskoeffizienten gewichteten Anzahl  $n$  von Tryptophan- und Tyrosin-Resten sowie der Disulfidbrücken (Holtzhauer, 1996) errechnen:

$$\epsilon_{280} = 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot n_{\text{Tryptophan}} + 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot n_{\text{Tyrosin}} + 125 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot n_{\text{Disulfidbrücken}} \quad (2)$$

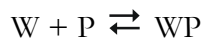
Die molaren Extinktionskoeffizienten der in dieser Arbeit verwendeten Proteine sind in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8:** Molare Extinktionskoeffizienten (nach Gleichung 2 berechnet)

Protein	Varianten	$\epsilon_{280}$ (in $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )
GST-WW	wt, D24C, K35C	58 330
WW-Domäne, isoliert	wt, D24C, K35C, biotinyliert	15 470
PP-GFP	PP-GFP, C-PP-GFP	21 890
GST-WW-PP-GFP, disulfidverbrückt		80 345

### II.12.2. Bindungsanalysen mittels Fluoreszenzspektroskopie (Fluoreszenztitration)

Die Bindung der Polyprolin-Peptidliganden an Varianten der isolierten WW-Domäne wurde anhand der intrinsischen Fluoreszenz der beiden Tryptophane W17 und W39 der WW-Domäne analysiert. Dabei führt eine Anlagerung des Liganden an die WW-Domäne aufgrund der gegenseitigen Affinität u.a. zu einer Veränderung der Hydrophobizität in der unmittelbaren Umgebung der Tryptophane, was sich in veränderten Fluoreszenzeigenschaften dieser Aminosäuren äußert (Eftink, 1997). Verfolgt man nun beispielsweise die Intensitätsänderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration des Liganden (Fluoreszenztitration), so lässt sich daraus die Bindungsstärke bestimmen, die in Form der Dissoziationskonstante  $K_D$  angegeben wird. Für das Gleichgewicht der Bindung von Ligand (P) an die isolierte WW-Domäne (W):



unter Bildung des Komplexes (WP) definiert sich die Dissoziationskonstante  $K_D$  wie folgt:

$$K_D = \frac{[\text{W}] \cdot [\text{P}]}{[\text{WP}]} \quad (3)$$

Dabei lassen sich die Konzentrationen von W und P im Gleichgewicht als  $[\text{W}_0] - [\text{WP}]$  bzw.  $[\text{P}_0] - [\text{WP}]$  ausdrücken, wobei  $[\text{W}_0]$  bzw.  $[\text{P}_0]$  die eingesetzten Konzentrationen von WW-Domäne und Ligand darstellen. Nach dieser Substitution und Umstellung von Gleichung 3 lässt sich die Konzentration des gebildeten Komplexes WP folgendermaßen ausdrücken:

$$[\text{WP}] = \frac{[\text{W}_0] + [\text{P}_0] + K_D}{2} - \sqrt{\left( \frac{[\text{W}_0] + [\text{P}_0] + K_D}{2} \right)^2 - [\text{W}_0][\text{P}_0]} \quad (4)$$

Die während der Bindungsmessung beobachtete Fluoreszenzintensität  $F_{\text{obs}}$  setzte sich zusammen aus der intrinsischen Fluoreszenz der freien WW-Domäne in Abwesenheit des Liganden ( $F_{\text{frei}}$ ) sowie einem zunehmenden Fluoreszenzanteil, der aus der Zunahme der Konzentration des gebildeten Komplexes WP resultierte (Gleichung 5).

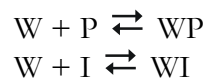
$$F_{obs} = F_{frei} + (F_{sat} - F_{frei}) \cdot \frac{[WP]}{[W_0]} \quad (5)$$

$F_{sat}$  entspricht dabei der theoretisch zu beobachtenden Fluoreszenzintensität bei vollständiger Bindung aller WW-Domänen-Moleküle durch Liganden (Sättigung,  $[WP]/[W_0]=1$ ). Aus der mathematischen Anpassung der experimentellen Daten durch nichtlineare Regression (Programm Sigma-Plot) nach Gleichung 4 und 4 läßt sich schließlich die Dissoziationskonstante  $K_D$  bestimmen.

Die Bindungsanalysen erfolgten unter Verwendung einer rührbaren 1 cm Quartz-Küvette (Probenvolumen 2700  $\mu$ l) mit Hilfe eines temperierbaren UV/VIS-Fluoreszenzspektrometers unter Vorlage der WW-Domäne und nachfolgender schrittweisen Zugabe (Titration) des Liganden. Die Fluoreszenz wurde bei 295 nm angeregt und in Form des Emissionsspektrums von 315-355 nm detektiert, wobei die Auswertung nur die Intensitätsänderung bei 340 nm berücksichtigte (Spaltöffnungen für Anregung und Emission 2,5 nm, Integrationszeit 0,2 s).

### II.12.3. Bestimmung der Dissoziationskonstante durch Bindungskompetition

Bei der kompetitiven Inhibition einer 1:1 Bindung eines bestimmten Liganden an die WW-Domäne belegen Ligand (P) und Kompetitor (I) die gleiche Bindungsstelle der WW-Domäne (W), wobei die Assoziation des einen Partners an ein Molekül der WW-Domäne die Bindung des anderen ausschließt.



Der Kompetitor (in der Enzymologie auch als Inhibitor bezeichnet) der Bindung kann dabei ebenfalls als Ligand betrachtet werden, dessen Affinität zur WW-Domäne, durch die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_I$  gekennzeichnet wird. Dabei hat der  $K_I$ -Wert für den WW-Kompetitor-Komplex die gleiche Bedeutung wie  $K_D$  für den WW-Ligand-Komplex.

Ist der  $K_D$ -Wert der kompetierten Bindung bekannt, so läßt sich  $K_I$  durch Analyse der Bildung des WW-Ligand-Komplexes in Abhängigkeit von der Kompetitor-Konzentration bestimmen. Bei Kenntnis von  $K_I$  läßt sich dementsprechend  $K_D$  bestimmen. Die Konzentration des gebildeten WW-Ligand-Komplexes (WP) kann durch folgenden Zusammenhang ausgedrückt werden:

$$[WP] = \frac{[WP_0] \cdot IC_{50}}{[I] + IC_{50}} \quad (6)$$

Dabei entspricht  $WP_0$  dem Signal, das für die Bindung in Abwesenheit des Kompetitors beobachtet wurde. Der  $IC_{50}$ -Wert steht für die Kompetitor-Konzentration, unter der die Bindung auf 50 % des Ausgangswertes  $WP_0$  herabgesetzt wird, I bezieht die variierte Konzentration des Kompetitors. Die Ermittlung von  $K_I$  aus dem  $IC_{50}$ -Wert erfolgte anhand von Gleichung 7:

$$IC_{50} = \frac{[W]}{2} + K_I + \frac{[P] \cdot K_I}{K_D} \quad (7)$$

W und P korrespondierten den eingesetzten Konzentrationen der WW-Domäne bzw. des Liganden und wurden konstant gehalten.

#### II.12.4. Bestimmung der thermodynamischen Bindungsparameter (van't Hoff-Analyse)

Bei der thermodynamischen Betrachtung eines Bindungsgleichgewichtes setzt sich die auftretende Bindungsenergie aus dem enthalpischen und dem entropischen Anteil zusammen. Aus der Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskonstante können die Bindungsenthalpie und Bindungsentropie  $\Delta S$  bestimmt werden, um zu analysieren, ob die Bindung enthalpisch oder entropisch determiniert ist. Allerdings liefert diese Untersuchung nur unter der Voraussetzung ein sinnvolles Ergebnis, daß sich die Wärmekapazität des untersuchten Systems im betrachteten Temperaturbereich nicht ändert. Gleichung 8 beschreibt den Zusammenhang zwischen der freien Bindungsenergie  $\Delta G$  (formuliert als Gibb'sche Energie) und Temperatur  $T$  und Dissoziationskonstante  $K_D$  sowie die Aufteilung in enthalpischen ( $\Delta H$ ) und entropischen Anteil ( $T \cdot \Delta S$ ).  $R$  entspricht dabei der universellen Gaskonstante.

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln K_D = \Delta H_{obs} - T \cdot \Delta S_{obs} \quad (8)$$

Die Dissoziationskonstanten des Komplexes von WW-Domäne und einem prolinreichen Liganden in WW Puffer HB wurden bei verschiedenen Temperaturen im Bereich von 8°C bis 28°C bestimmt (Abschnitt II.12.2). Unter Annahme von  $\Delta C_p = 0$  ließ sich die Bindungsenthalpie  $\Delta H_{obs}$  aus dem Anstieg ( $\Delta H_{obs}/R$ ) der angepassten Gerade der Auftragung von  $\ln K_D$  gegen  $1/T$  ermitteln (van't Hoff-Auftragung). Der entropische Anteil wurde mit  $T \cdot \Delta S_{obs} = \Delta H_{obs} - \Delta G$  berechnet.

#### II.12.5. pH-Titration der Ligandenbindung

Beobachtet man bei Bindungsstudien eine Abhängigkeit der Dissoziationskonstante vom pH-Wert des Puffers und läßt sich annehmen, daß die Unterschiede nicht aufgrund veränderter Stabilitäten der beteiligten Proteine zustande kommen, so liegt die Vermutung nahe, daß Aminosäuren des Rezeptors oder Liganden protoniert bzw. deprotoniert werden, die an der Ligandenbindung beteiligt sind. Gleichung 9 beschreibt diese Abhängigkeit der beobachteten Dissoziationskonstante  $K_{obs}$  vom pH-Wert für einen bestimmten Protonenübergang.

$$K_{obs} = \frac{K_{xh} + K_x \cdot 10^{pH - pK_a}}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad (9)$$

Dabei sind  $K_{xh}$  und  $K_x$  die Dissoziationskonstanten der vollständig protonierten bzw. deprotonierten Spezies. Der  $pK_a$ -Wert definiert den pH-Wert bei dem die ionisierbare Gruppe zu 50% protoniert/deprotoniert vorliegt und ist charakteristisch für bestimmte Aminosäuren. Typische Werte sind in der Literatur tabelliert (Harlow & Lane, 1988).

Die Abhängigkeit der Dissoziationskonstante des Komplexes von WW-Domäne und einem prolinreichen Liganden (Abschnitt II.12.2) wurde durch Variation des pH-Wertes des Puffers im Bereich von 5.5 bis 8.5 analysiert (Temperatur: 25°C, verwendete Pufferbasis: 'WW-Puffer PA' < pH 7, 'WW-Puffer TA' > pH 7). Die erhaltenen Daten wurden nach Gleichung 8 nichtlinear angepasst und daraus der  $pK_a$ -Wert ermittelt.

#### II.12.6. Bestimmung des Redoxpotentials und der freien Energie

Das Redoxpotential beschreibt das Bestreben eines Elektronendonors Elektronen an einen Akzeptor zu übertragen und wird daher auch als Elektronenübertragungspotential (Reduktionspotential) bezeichnet. Eine Redoxreaktion nach dem Schema



ist mit der Übertragung von  $n$  Elektronen von  $A$  (Donor) zu  $B$  (Akzeptor) verbunden. Die jeweiligen Redoxpotentiale  $E$  (in V) der beteiligten Redoxpaare ( $A_{\text{ox}}/A_{\text{red}}$  bzw.  $B_{\text{ox}}/B_{\text{red}}$ ) in isoliertem Zustand ergeben sich aus den Konzentrationen ihrer reduzierten und oxidierten Spezies bestimmt durch die Nernstsche Gleichung:

$$E = E^\circ - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \frac{[\text{reduziert}]}{[\text{oxidiert}]} \quad (10)$$

$E^\circ$  (in V) entspricht dabei dem Standardredoxpotential des Paares unter definierten Bedingungen bezogen auf die Wasserstoff-Standardelektrode ( $E=0$  V),  $R$  der Gaskonstante ( $8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $T$  der Temperatur (in K),  $n$  der Anzahl übertragener Elektronen und  $F$  der Faraday-Konstante ( $96.5 \text{ kJ} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). In einer Redoxreaktion werden die Elektronen dabei stets vom Redoxpartner mit negativerem Redoxpotential auf das Redoxpaar mit höherem Redoxpotential übertragen. Die Differenz beider Redoxpotentiale ist Ausdruck für die elektronenmotorische Kraft, mit der die Übertragung der Elektronen stattfindet. Ist das Redoxpotential eines Redoxpaars für bestimmte Bedingungen bekannt, wie z.B. für GSSG/GSH (bei pH 7, 25°C:  $E^\circ = -240$  mV, bei pH 8, 25°C:  $E^\circ = -299$  mV), so läßt sich das Redoxpotential eines zweiten Paares für diese Bedingungen ebenfalls bestimmen. In der vorliegenden Arbeit entsprach das zweite Redoxpaar dem disulfidverbrückten WW-Ligand-Komplex zusammen mit den reduzierten Spezies der Einzelkomponenten (WW-PP/WW-SH + PP-SH). Analog zu Gleichung 9 wurde das Redoxpotential des disulfidverbrückten WW-Ligand-Komplexes durch Variation der Redoxbedingungen (Verhältnis von GSSG/GSH) aus der Gleichgewichtskonstante der Kopplungsreaktion bestimmt. Das Redoxpotential des WW-Ligand-Komplexes  $E^\circ_{\text{WWPP}}$  unter den experimentellen Bedingungen errechnete sich daraufhin mit:

$$E^\circ_{\text{WWPP}} = E^\circ_{\text{GSSG/GSH}} - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln K \quad (11)$$

Dabei beschreibt  $K$  die Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion (vgl. Abschnitt III.3.4.5). Die freie Energie  $\Delta G^\circ$  der Redoxreaktion unter den gewählten Bedingungen ergibt sich aus folgendem Zusammenhang:

$$\Delta G^\circ = -n \cdot F \cdot \Delta E^\circ \quad (12)$$

mit 
$$\Delta E^\circ = E^\circ_{\text{GSSG/GSH}} - E^\circ_{\text{WWPP}} \quad (13)$$

In der vorliegenden Arbeit entsprachen Glutathion (GSSG) dem Elektronenakzeptor und reduzierte WW-Domäne bzw. prolinreicher Ligand dem Elektronendonator.

### II.12.7. Chemisch induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge

Zur Messung von chemisch induzierten Entfaltungsübergängen der isolierten WW-Domäne wurde die native WW-Domäne in 'WW-Puffer TA' mit Guanidiniumhydrochlorid-Konzentrationen zwischen 0 und 6 M verdünnt und für 1 h inkubiert. Die Rückfaltung wurde durch identische Verdünnung initiiert, dabei wurde allerdings von der denaturierten WW-Domäne (in 6M GdnHCl) ausgegangen. Die genaue GdnHCl-Konzentration jedes Ansatzes wurde refraktrometrisch nach Gleichung 14 bestimmt (Pace, 1986):



$$[\text{GdnHCl}] = 57.147 \cdot \Delta n + 38.68 \cdot \Delta n^2 - 91.6 \cdot \Delta n^3 \quad (14)$$

$\Delta n$  entspricht dabei der Differenz der Brechungsindizes der Pufferlösung mit und ohne Guanidinhydrochlorid.

Die Übergänge von Entfaltung und Rückfaltung wurden sowohl mittels Fluoreszenzspektroskopie als auch durch Fern-UV-CD-Spektroskopie verfolgt. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten bei einer Endkonzentration der isolierten WW-Domäne von 1,6  $\mu\text{M}$  in einer rührbaren 1 cm Quartz-Küvette (Probenvolumen 2,7 ml) bei 25°C mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers. Die Fluoreszenz wurde bei 280 nm angeregt und in Form des Emissionsspektrums von 300-400 nm detektiert, wobei zur Auswertung nur die Intensitätsänderung bei 340 nm berücksichtigt wurde (Spaltöffnungen für Anregung und Emission 5 nm, Integrationszeit 0.2 s). Die Verfolgung des Circular dichroismus bei der Entfaltung bzw. Rückfaltung erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 45  $\mu\text{M}$  in einer 1 mm Quartz-Küvette (Probenvolumen 280  $\mu\text{l}$ ) bei 25°C am CD-Spektrometer. Dabei wurde die Änderung der Elliptizität  $\Theta$  bei 230 nm (Akkumulation von 3 Spektren, Integrationszeit 15 s) in Abhängigkeit von der GdnHCl-Konzentration der Probe analysiert.

Die gemessene Elliptizität  $\Theta$  konnte nach Pufferkorrektur in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest  $\Theta_{MRW}$  (in  $\text{Grad}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ) nach Gleichung 15 umgerechnet werden.

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M}{d \cdot c \cdot n_{AS}} \quad (15)$$

M beziffert die Molekularmasse des Proteins (in Da),  $d$  entspricht der Schichtdicke der Küvette (in cm),  $c$  der Proteinkonzentration (in mg/ml) und  $n_{AS}$  der Anzahl der Aminosäuren. Elliptizitäten werden in Grad angegeben.

Die Auswertung der Übergänge erfolgte unter Annahme eines Zwei-Zustands-Modells. Die freie Stabilisierungsenergie der (theoretischen) Entfaltung in Wasser ( $\Delta G_{H_2O}$ ) wurde einerseits durch lineare Extrapolation der erhaltenen  $\Delta G$ -Werte auf 0 M Guanidinhydrochlorid bestimmt (Pace, 1986) und andererseits durch nichtlineare Regression der Gleichung 16 ermittelt (Santoro & Bolen, 1988).

$$Y = \frac{(F_N + m_N \cdot D) + (F_D + m_D \cdot D) \cdot e^{\frac{m \cdot D - \Delta G_{H_2O}}{R \cdot T}}}{1 + e^{\frac{m \cdot D - \Delta G_{H_2O}}{R \cdot T}}} \quad (16)$$

Dabei entspricht Y dem angepassten Wert der Messgröße,  $F_N$  und  $F_D$  sind die Anfangs- und Endwerte der Messgröße bei 0M GdnHCl bzw. 6M GdnHCl. Die Kooperativität des Übergangs wird durch m ausgedrückt, wobei  $m_N$  und  $m_D$  zusätzliche Faktoren sind, die eine GdnHCl-bedingte Änderung der Messgröße im Bereich des nativen ( $m_N$ ) bzw. denaturierten ( $m_D$ ) Zustands berücksichtigen (Neigung der Plateaus). D entspricht der Konzentration des Denaturierungsmittels (in M),  $\Delta G_{H_2O}$  der freien Stabilisierungsenergie (in kJ/mol), T der Temperatur (in K) und R der universellen Gaskonstante (8.29 J/mol/K).

### II.12.8. Analyse thermisch induzierter Entfaltungsübergänge

Zum qualitativen Vergleich der thermischen Stabilität von GST-WW, PP-GFP sowie dem kovalenten Assoziationsprodukt der beiden Proteine wurden thermisch induzierte Entfaltungsübergänge aufgenommen, die sowohl über einer Änderung der Fluoreszenzintensität



als auch der Lichtstreuung verfolgt wurden. Dazu wurde die Proteinkonzentration auf 500 nM in 'WW-Puffer P-FL' eingestellt. Die Messung erfolgte in einer rühr- und verschließbaren 1 cm Quartz-Küvette (Probenvolumen: 3 ml) an einem Fluoreszenzspektrometer (Fluoromax 3) mit Peltier-Temperatursteuerung. Die Temperatur wurde in einem Bereich von 20°C bis 95°C schrittweise (Intervall 1°C, Toleranz: 0.2 °C, Äquilibrierungszeit 30 s) erhöht und die Intensitätsänderung der GFP-Fluoreszenz (Anregung: 490 nm, Emissionsmessung: Mittelwert aus drei Spektren aufgenommen von 505-525 nm mit jeweils 0.1 s Integrationszeit je nm, ausgewertete Wellenlänge: 515 nm) bzw. der Lichtstreuung (Anregung: 600 nm, Streulichtmessung: Mittelwert aus drei Spektren aufgenommen von 590-610 nm mit jeweils 0.1 s Integrationszeit je nm, ausgewertete Wellenlänge: 600 nm) verfolgt. Daraus ergibt sich eine durchschnittliche Heizrate von 1.1 °C/min.

### II.12.9. Differential Scanning-Kalorimetrie (DSC)

Bei dieser Methode wird die Änderung der Wärmekapazität von Biomolekülen gemessen, die mit strukturellen Änderungen, beispielsweise bei der Entfaltung von Proteinen, einhergeht (Cooper & Nutley, 2001). Dazu wird anhand eines *Differential Scanning* Mikrokalorimeters (VPDSC) die Wärmeaufnahme bzw. -abgabe einer Proteinlösung gemessen, die während der thermischen Denaturierung auftritt. Im Vergleich dazu wird der jeweilige Puffer als Referenz mitgeführt. Der Betrag der ermittelten, mit dem Pufferwert korrigierten Wärmemenge (Enthalpie) korreliert mit der thermischen Stabilität des Proteins unter den gewählten Bedingungen.

In dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um den Übergangsmittelpunkt ( $T_m$  in °C) im Verlauf der thermischen Entfaltung der isolierten WW-Domäne zu ermitteln. Dazu wurden 700 µl der Proteinprobe (Proteinkonzentration 110 µM in 'WW-Puffer P-FL') in die Probenzelle des Mikrokalorimeters, sowie 700 µl 'WW-Puffer P-FL' in die Referenzzelle gegeben (reales Zellvolumen: 518 µl). Mit einer Heizrate von 60°C/min wurde von 10°C bis 110°C aufgeheizt und sukzessive abgekühlt. Die Ermittlung des  $T_m$  erfolgte mit der dazugehörigen Software (MicroCal Origin, DSC-Modul) aus den Aufheizkurven.

### II.12.10. Massenspektrometrie

Die Bestimmung der Molekularmassen von Peptiden und Proteinen mittels massenspektrometrischer Verfahren wurde freundlicherweise von Dr. Angelika Schierhorn und Dr. Marc Kipping (Max-Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) durchgeführt. Die Proben wurden zuvor durch RP-HPLC (Abschnitt II.10.7) gereinigt und entsalzt und als Lösung in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch der Massenbestimmung unterzogen. Elektrospray-Ionisations-Massenspektren (ESI-MS) wurden an einem Esquire-LC Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker Analytik, Bremen) aufgenommen. MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem REFLEX Spektrometer (Bruker Analytik, Bremen) aufgenommen.

### II.12.11. Strukturmodellierung und -visualisierung

Die Strukturmodellierung der FBP11-WW-Domäne 1, die als Basis für die Generierung der beiden Cystein-Varianten WW-D24C und WW-K35C verwendet wurde, folgte dem Prinzip der vergleichenden Homologiemodellierung (Sali & Blundell, 1993). Dazu wurde das Programmpaket 'Modeller 4' verwendet, als strukturelles Templat diente die bekannte Kristallstruktur der humanen Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase Pin1 (PDB-Code: 1PIN, Ranganathan et al., 1997). Die Rechnungen wurden freundlicherweise von Dr. Gerald Böhm (ACGT Progenomics, Halle) durchgeführt. Der Ligand PPPLPP wurde anhand einer strukturellen Überlagerung des FBP11-WW1-Modells mit der NMR-Struktur der YAP65-WW-Domäne in Komplex mit einem prolinreichen Liganden (Macias et al., 1996) manuell eingepasst.

Die Modellierungen der Fusionsproteine GST-WW-K35C und C-PP-GFP sowie sämtliche, in dieser Arbeit verwendeten Moleküldarstellungen erfolgten mit dem Programm PyMOL (Delano, 2002). Die verwendeten Stereodarstellungen wurden nach dem Prinzip des 'relaxed eye-' oder 'wall eye'-Stereo angefertigt (6° Winkelunterschied der einzelnen Bilder, linkes Bild für linkes Auge, rechtes Bild für rechtes Auge). Die Modellstruktur von GST-WW-K35C basiert auf der Kristallstruktur der Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* (PDB-Code: 1GNE, Lim et al., 1994a) und der NMR-Struktur von FBP11-WW1 in Abwesenheit des prolinreichen Liganden. Das Strukturmodell von C-PP-GFP wurde anhand der Kristallstruktur des GFP (PDB-Code: 1EMA, Ormo et al., 1996) und dem prolinreichen Ligandenpeptid in Polyprolinhelix-II-Konformation generiert. Beide Modelle stellen keine energieminierten Strukturen dar, sondern dienen lediglich der Veranschaulichung.

### II.12.12. Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur Aufklärung der Strukturen von freier FBP11-WW-Domäne 1 sowie des Komplexes von FBP11-WW1 mit einem prolinreichen Liganden sind Ergebnis von kernresonanzspektroskopischen Untersuchungen, die freundlicherweise von Prof. José Ricardo Pires (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasilien bzw. Arbeitsgruppe Hartmut Oschkinat, Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) durchgeführt wurden. Sämtliche NMR-Spektren wurden - sofern nicht anders angegeben - bei 298 K an 'DRX600' Spektrometern (600 MHz Protonenfrequenz, Bruker) aufgenommen und mit den Softwarepaketen 'XWINNMR' (Bruker) und 'Sparky 3' (Goddard & Keneller, 2002) prozessiert bzw. analysiert.

Die Charakterisierung des Faltungszustandes der verschiedenen Varianten von FBP11-WW1 (WW-wt, WW-AKSM, WW-D24C, WW-K35C sowie von kovalenten Komplexen der Cystein-Varianten mit prolinreichen Liganden) erfolgte durch homonukleare <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie mit unmarkierten Proben. Die Interpretation erfolgte u.a. anhand der charakteristischen chemischen Verschiebungen der Protonenresonanzen (Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Chemische Verschiebungen der <sup>1</sup>H-Resonanzen in gefalteten Proteinen (Cavanagh et al., 1996)

Protonen-Spezies	chemische Verschiebung [ppm] <sup>1</sup>
CH <sub>3</sub>	-0.2 - 1.2
aliphatisch	-0.5 - 3.5
C <sub>α</sub> H	3.5 - 5.7
Wasser	4.7
Seitenketten NH	6 - 7.8
aromatisch	6.6 - 8
Peptidrückgrat NH	6.8 - 10.5
Indol-N <sub>ε</sub> H	10 - 11

<sup>1</sup> ± 0.2 ppm

Die für die Strukturaufklärung erforderlichen NMR-Messungen erfolgten durch Aufnahme der chemischen Verschiebungen anhand von zwei- und dreidimensionalen NMR-Experimenten mit unmarkierten, einfach (<sup>15</sup>N) und doppelt (<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C) isotoopenmarkierten Proben der isolierten WW-Domäne (Variante WW-AKSM) sowohl ohne als auch in Gegenwart des prolinreichen Liganden PPN4. Die Spektren der freien WW-Domäne (ohne Ligand) wurden bei einer

Proteinkonzentration von 1.8 mM in 'WW-Puffer P-NMR' in Gegenwart von 10% (v/v) D<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur strukturellen Untersuchung des Komplexes von WW-AKSM mit einem prolinreichen Liganden wurde das Peptid PPN4 in einer Konzentration von 3.6 mM (Verhältnis Ligand zu WW-Domäne: 2:1) zugesetzt.

Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen sämtlicher <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-Atome (Nomenklatur siehe Anhang VII.4) erfolgte schrittweise durch Aufnahme verschiedener mehrdimensionaler NMR-Spektren (Tabelle 10). Die Zuordnung der Signale des gebundenen Liganden erfolgte durch geeignete Filtertechniken, die eine Unterscheidung der Signale des unmarkierten Peptides (Ligand) und der markierten WW-Domäne ermöglichten.

**Tabelle 10:** NMR-Spektren zur sequenziellen Zuordnung der Resonanzsignale und Ableitung der Strukturen von freier WW-Domäne sowie des Komplexes. Die dabei erhaltenen Signale korrespondieren jeweils NMR-aktiven Kernen (<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C), die Aminosäuren 'i-1' und 'i' sind in der Primärstruktur aufeinanderfolgend, 'i' und 'j' sind in räumlicher Nähe und lassen sich anhand der NOE-Signale identifizieren (siehe Abbildung 70 im Anhang).

Zielstellung	NMR-Spektrum	korrelierte Signale
Identifizierung der Amid-Signale (NH) aller Aminosäuren und sequentielle Zuordnung der Signale des Peptidrückgrates (C <sup>α</sup> , NH) sowie C <sup>β</sup> der Seitenketten	<sup>15</sup> N-HSQC	<sup>15</sup> N <sub>i</sub> <sup>NH</sup> , <sup>1</sup> H <sub>i</sub> <sup>NH</sup>
	CBCA(CO)NNH	<sup>15</sup> N <sub>i</sub> <sup>NH</sup> , <sup>1</sup> H <sub>i</sub> <sup>NH</sup> , <sup>13</sup> C <sub>i-1</sub> <sup>α/β</sup>
	CBCANNH	<sup>15</sup> N <sub>i</sub> <sup>NH</sup> , <sup>1</sup> H <sub>i</sub> <sup>NH</sup> , <sup>13</sup> C <sub>i-1</sub> <sup>α/β</sup>
Zuordnung der restlichen Signale der Seitenketten (C <sup>γ</sup> - C <sup>ε</sup> , H <sup>β</sup> - H <sup>ε</sup> )	HBHA(CBCACO)NNH	<sup>15</sup> N <sub>i</sub> <sup>NH</sup> , <sup>1</sup> H <sub>i</sub> <sup>NH</sup> , <sup>1</sup> H <sub>i-1</sub> <sup>α/β</sup>
	H(CCC)NNH	<sup>15</sup> N <sub>i</sub> <sup>NH</sup> , <sup>1</sup> H <sub>i</sub> <sup>NH</sup> , <sup>1</sup> H <sub>i-1</sub> <sup>γ/δ/ε</sup>
	CCCNNH	<sup>15</sup> N <sub>i</sub> <sup>NH</sup> , <sup>1</sup> H <sub>i</sub> <sup>NH</sup> , <sup>13</sup> C <sub>i-1</sub> <sup>γ/δ/ε</sup>
Identifizierung räumlich benachbarter Protonen und Ableitung der dreidimensionalen Struktur	<sup>15</sup> N-HSQC-NOESY (Mischzeit: 150 ms)	<sup>15</sup> N <sub>i</sub> <sup>NH</sup> , <sup>1</sup> H <sub>i</sub> <sup>NH</sup> , <sup>1</sup> H <sub>j</sub>
	<sup>13</sup> C-HMQC-NOESY (Mischzeit: 100 ms)	<sup>13</sup> C <sub>i</sub> <sup>α/β/γ/δ/ε</sup> , <sup>1</sup> H <sub>i</sub> <sup>α/β/γ/δ/ε</sup> , <sup>1</sup> H <sub>j</sub>
	<sup>1</sup> H <sup>1</sup> H-NOESY (Mischzeit: 200 ms)	<sup>1</sup> H <sub>i</sub> , <sup>1</sup> H <sub>j</sub>
Zuordnung/Unterscheidung der chemischen Verschiebungen des gebundenen Liganden	<sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C-gefiltertes TOCSY	<sup>1</sup> H <sub>i</sub> , <sup>1</sup> H <sub>j</sub> (unmarkiert)
	<sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C-gefiltertes NOESY	<sup>1</sup> H <sub>i</sub> , <sup>1</sup> H <sub>j</sub> (unmarkiert)

Zur Berechnung der Strukturen wurden eine Reihe mehrdimensionaler NOESY-Spektren aufgenommen (Tabelle 10) und die erhaltenen NOE-Signale interpretiert (Ableitung von Distanzlimits, so genannten *distance restraints*). Zu Beginn wurden durch manuelle Zuordnung eindeutige NOE (H<sup>NH</sup>-H<sup>NH</sup>, H<sup>α</sup>-H<sup>α</sup>, H<sup>NH</sup>-H<sup>α</sup>) ausgewählt, die vorwiegend charakteristisch für Sekundärstrukturen sind, und daraus eine vorläufige Struktur errechnet. Mit Hilfe der Software ARIA (Nilges & O'Donoghue, 1998; Linge et al., 2001) wurden anhand dieser Struktur in einem iterativen Prozess weitere NOE automatisch zugeordnet, die manuell überprüft wurden, und erneut der Strukturrechnung unterzogen. Anhand von tabellierten Werten für den Einfluß von Sekundärstrukturen auf die chemische Verschiebung der Aminosäurereste (CSI, Wishart & Sykes, 1994) ließen sich Vorhersagen zu Sekundärstrukturen der WW-Domäne treffen aus denen bestimmte Dihedralwinkel-Limits (φ, ψ) abgeleitet wurden. Zusammen mit Wasserstoffbrücken-Limits, die aus NOEs charakteristisch für Sekundärstrukturelemente hergeleitet wurden, gingen diese in erneute Strukturberechnungen mittels ARIA und CNS (Brunger et al., 1998) ein. Innerhalb des letzten ARIA-Iterationszyklus wurden 200 mögliche Strukturen berechnet. Aus

den 30 energieärmsten Strukturen wurde eine mittlere Struktur errechnet und 15 Strukturen mit den geringsten Abweichungen von dieser Struktur als repräsentative Auswahl verwendet. Die Bestimmung der Struktur des Komplexes erfolgte in Analogie zur freien WW-Domäne. Zusätzlich wurden 15 intermolekulare NOE identifiziert, die manuell durch Vergleich von 2D- und 3D-NOESY-Spektren der freien WW-Domäne und des Komplexes zugeordnet wurden. Daraus konnte eine vorläufige Struktur des Komplexes errechnet werden, weitere 25 intermolekulare NOE ließen sich automatisch durch ARIA zuordnen. Der prolinreiche Ligand PPN4 wurde anhand von zusätzlichen Dihedralwinkel-Limits ( $\phi$ ,  $\psi$ ) in Polyprolin-II-Helix-Konformation gehalten. Weitere drei intermolekulare Wasserstoffbrücken-Bindungen wurden auf Basis vorläufiger Strukturrechnungen hinzugefügt.

### III. Ergebnisse

#### III.1. Charakterisierung der WW-Domäne FBP11-WW1

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Varianten der ersten WW-Domäne aus FBP11 (FBP11-WW1) hergestellt und untersucht. Diese Varianten unterschieden sich entweder durch unterschiedliche N-Termini (WW-wt, WW-AKSM und WW- $\Delta ket$ ) oder waren andererseits Punktmutanten der Variante WW-wt (WW-D24C und WW-K35C, Sequenzen siehe Abschnitt II.9.5). Abschnitt III.1 beinhaltet hauptsächlich die Ergebnisse der Charakterisierung der cysteinfreien Varianten. Einige biophysikalische und biochemische Eigenschaften der Cystein-Varianten von FBP11-WW1, die für die Etablierung des Kopplungssystems essentiell waren, werden separat in Abschnitt III.3.2 beleuchtet.

##### III.1.1. Wildtyp-Varianten von FBP11-WW1: WW-AKSM und WW- $\Delta kt$

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Verfügbarkeit der GST-Fusion von WW-wt in Form des Expressionsplasmids pGEX-2TK-WW (Bedford et al., 1997), das die Aminosäuren W17 bis D44 der ersten WW-Domäne aus FBP11 enthielt. Bedingt durch die Verwendung dieses Expressionssystems, resultierte nach der proteolytischen Spaltung von GST-WW-wt die 36 Aminosäuren lange Variante WW-wt, die am N-Terminus 9 Aminosäuren aufwies, die nicht zur WW-Domäne gehörten (Kinase-Erkennungssequenz zwischen zwei Gly/Ser-Linkern). Dabei war sowohl der Einfluß dieser 9 fremden Aminosäuren auf die Struktur, Funktion und Stabilität der isolierten WW-Domäne unklar, als auch die minimal erforderliche Länge des Konstrukts ungewiß, die eine korrekte Faltung der Domäne im isolierten Zustand ermöglicht. So wurde als problematisch angesehen, daß WW-wt vor W17 keine weiteren Aminosäuren der natürlichen FBP11-Sequenz enthielt. Untersuchungen hatten für WW-Domänen der Klassen I und IV ergeben, daß mindestens ein weiterer, konservierter Rest (P14) für die strukturelle Integrität dieser WW-Domänen erforderlich ist (Macias et al., 1996; Verdecia et al., 2000). Da die WW-Domänen der Klassen II und III diese konservierte Aminosäure nicht aufwiesen, wurde vermutet, daß die Stabilität vermutlich durch Anwesenheit anderer Reste an dieser Position vermittelt wird. Infolgedessen wurde das Konstrukt WW-AKSM erstellt, bei dem vier weitere Aminosäuren der natürlichen Sequenz (Ala, Lys, Ser, Met) vor W17 inseriert wurden (Abschnitt II.9.5). Da die allgemeine Faltungstopologie der WW-Domäne N- und C-Terminus in räumliche Nähe bringt (Macias et al., 1996), könnten die geladenen Aminosäuren (Lys, Asp) an den jeweiligen Enden durch Ausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen eine Stabilisierung der WW-Domäne bewirken.

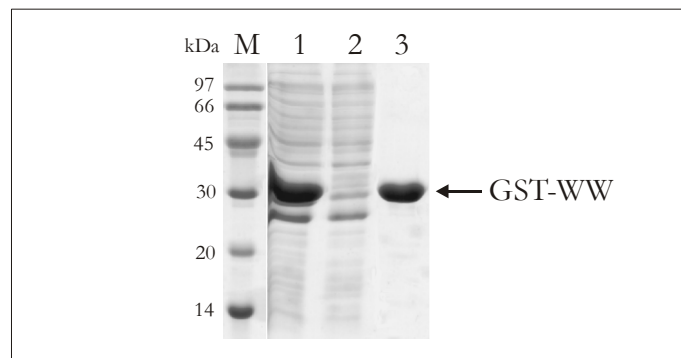
Die isolierten Varianten WW-wt bzw. WW-AKSM enthalten zu einem nicht unwesentlichen Anteil ( $\sim 25\%$ ) Aminosäuren, die nicht ursprünglich zu FBP11 gehören (*kinase tag*). Um den Einfluß dieser N-terminalen Verlängerung auf Struktur und Funktion von FBP11-WW1 beurteilen zu können, wurde von WW-AKSM ausgehend, das Konstrukt WW- $\Delta ket$  erstellt. Basierend auf dem Vektor pGEX-2T verbleiben bei dieser Variante nach der proteolytischen Abspaltung von GST lediglich zwei zusätzliche Aminosäuren (Gly, Ser) am N-Terminus (Abschnitt II.9.5).

##### III.1.2. Herstellung der isolierten WW-Domäne

Die Herstellung der isolierten WW-Domäne erwies sich als übertragbar auf die davon abgeleiteten Varianten. Im Folgenden werden daher die Ergebnisse von Expression und Reinigung der jeweiligen Varianten anhand von WW-wt verdeutlicht.

### III.1.2.1. Expression und Reinigung der GST-WW-Fusionsproteine

Die Fusion der WW-Domäne mit GST resultierte aus der Klonierung des Gens in den Expressionsvektor pGEX-2TK (Pharmacia Biosciences), der eine rekombinante Expression des Fusionsproteins in *E.coli* und nachfolgende Affinitätsreinigung aus dem löslichen Zellextrakt erlaubt (Smith & Johnson, 1988; Smith, 2000). Die ursprüngliche Identifizierung von FBP11-WW1 als Bindungspartner prolinreicher Liganden erfolgte ebenso im Kontext einer solchen GST-Fusion (Chan et al., 1996; Bedford et al., 1997). Die Anzucht von *E.coli* BL21(DE3) zur Expression von GST-WW wurde wie beschrieben (Abschnitt II.10.1) in 4 Litern LB-Amp-Medium im Schüttelkolben (2 x 2 Liter) durchgeführt. Die optische Dichte OD<sub>600</sub> betrug zum Zeitpunkt der Zellernte 2,5 (Feuchtgewicht der Zellen: 14 g). Nach dem Zellaufschluß wurde der lösliche Überstand (Zellextrakt) weiterverwendet und der Glutathion-Affinitätschromatografie (Abschnitt II.10.4) unterzogen. Die Analyse durch SDS-PAGE (Abbildung 15) zeigte eine deutliche Proteinbande im löslichen Zellextrakt in der Größe des GST-WW-Fusionsproteins (30,4 kDa). Diese Bande war in den Fraktionen des Durchlaufs nicht zu finden - ein Hinweis für die quantitative Bindung an die GSH-Säule. Das Fusionsprotein konnte in Gegenwart von 10 mM GSH eluiert werden und wies nach diesem Reinigungsschritt bereits eine Reinheit von >95% (geschätzt aus Coomassie-gefärbtem SDS-Gel) auf. Die photometrische Konzentrationsbestimmung der Fraktionen des gereinigten Proteins ergab eine Ausbeute von 264 mg GST-WW aus 4 Litern Kulturvolumen (bzw. 18 mg/g Zellen Feuchtgewicht).



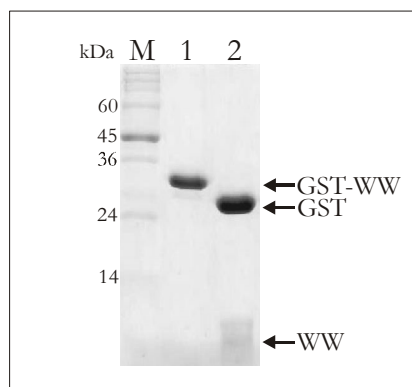
**Abbildung 15:** Analyse der Expression und Reinigung von GST-WW-Fusionen (15% SDS-Gel, Coomassie-Färbung) Spur 1: löslicher *E.coli* Zellextrakt, Spur 2: Fraktion des nicht gebundenen Zellextraktes (Durchlauf GSH-Säule), Spur 3: Elutionsfraktion des gereinigten GST-WW

Die erreichte Homogenität des gereinigten Proteins unterstreicht die hohe Effizienz der Glutathion-Affinitätschromatografie, die zum einen in der abundanten Menge GST-WW im Zellextrakt, als auch in der Tatsache begründet liegt, daß keine bakteriellen Isoformen der schistosomalen Glutathion-S-Transferase in *E.coli* existieren, die sonst ebenfalls Affinität zum Glutathion-Säulenmaterial zeigen würden. Die sehr gute Expression und Löslichkeit von GST im Cytosol von *E.coli* ist in zahlreichen Beispielen der bakteriellen Herstellung von GST-Fusionen mit Proteinen eukaryontischer Herkunft belegt (Braun et al., 2002). Sie stößt jedoch an ihre Grenzen bei der Expression von Fusionen mit größeren Proteinen (> 100 kDa), stark hydrophoben Polypeptiden sowie von Proteinen mit zahlreichen geladenen Aminosäuren (Smith & Johnson, 1988). Die hohen Ausbeuten bei der Expression der GST-WW-Varianten sind wahrscheinlich zum Großteil auf die geringe Größe der WW-Domäne in Relation zum Fusionspartner GST zurückzuführen. Zusätzlich wurde jedoch auch für andere Proteinfusionen mit dieser WW-Domäne ein positiver Einfluß auf die lösliche Expression in *E.coli* beschrieben (Schmidt et al., 2001).

### III.1.2.2. Gewinnung der isolierten WW-Domäne

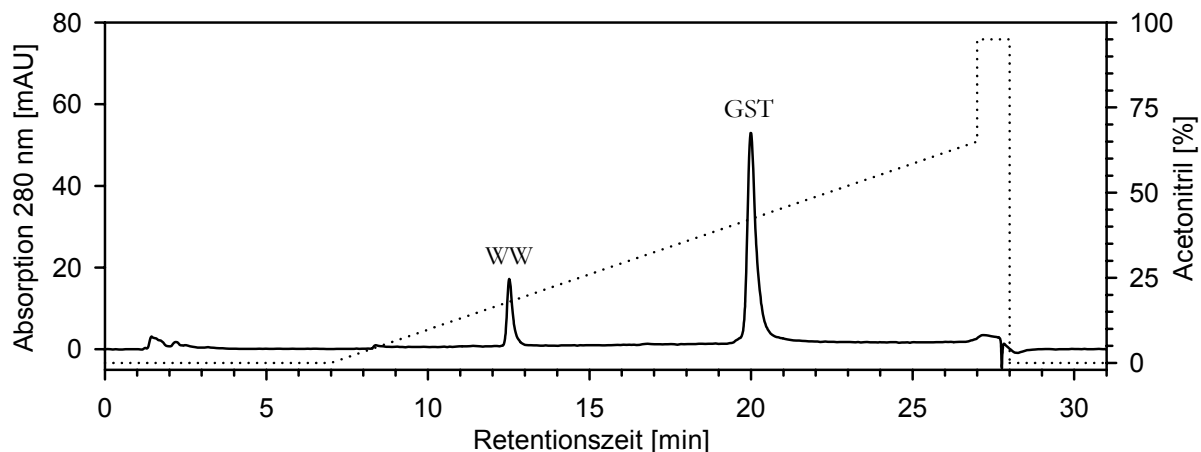
Die über die Expressionsvektoren pGEX-2T/2TK eingeführte Thrombinschnittstelle zwischen GST und WW-Domäne ermöglichte eine proteolytische Spaltung der beiden Fusionspartner. Dabei schneidet Thrombin innerhalb der Erkennungssequenz 'LVPRGS' zwischen Arg und Gly (Lundblad et al., 1976). Daraus folgt, daß nach der Spaltung am N-Terminus der WW-Domäne die beiden Aminosäuren Gly und Ser verbleiben. Zusätzlich enthalten Proteine, die im Vektor pGEX-2TK exprimiert und sukzessive von GST abgespalten werden, eine N-terminale Kinase-Erkennungssequenz ('RRASV'), die für eine radioaktive Markierung des Proteins verwendet werden kann, was jedoch nicht im Interesse dieser Arbeit stand. Um zu untersuchen, ob die zusätzliche Kinase-Erkennungssequenz die Stabilität und Funktion der WW-Domäne beeinträchtigt, wurde die Variante 'WW- $\Delta k$ ' kloniert (Abschnitt II.9.5, Abbildung 8), die diese Sequenz nicht enthielt.

Gereinigtes GST-WW wies eine sehr hohe Löslichkeit in 'GST-Elutionspuffer' auf und wurde mit Hilfe von Zentrifugationskonzentratoren bis zu einer Konzentration von 45 mg/ml (1,5 mM) aufkonzentriert. Die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins durch Thrombin wurde unter zuvor optimierten Bedingungen durchgeführt (16 h, 37°C, 45 mg/ml GST-WW, 2 U Thrombin je ml Spaltansatz bzw. 0.022 units Thrombin pro mg GST-WW).



**Abbildung 16:** SDS-PAGE-Analyse der Spaltung von 1.5 mM (45 mg/ml) GST-W-wt nach 16h Inkubation bei 37°C durch 2 U/ml Thrombin (entspricht 0.022 U/mg GST-WW-Fusion), Spur 1: Inkubation ohne Thrombin, Spur 2: Spaltung von GST-WW zu GST und isolierter WW-Domäne

Dabei wurden keine zusätzlichen Spaltprodukte beobachtet, die für eine unspezifische Proteolyse sprechen würden (Abbildung 16). Die entstandene isolierte WW-Domäne (4.3 kDa) war im 15% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgrund ihrer geringen Größe kaum zu detektieren. Im Gegensatz dazu ermöglichte die analytische und präparative Auftrennung des proteolytischen Spaltansatzes anhand einer 'Source15 RPC' RP-HPLC-Säule (Abschnitt II.10.7) eine Isolierung der WW-Domäne vom verbliebenen GST-Rest (25.7 kDa). Die Elution erfolgte im linearen Gradienten eines Wasser/Acetonitril-Gemisches in Gegenwart von 0.05% TFA (Abbildung 17), wobei die isolierte WW-Domäne aufgrund ihrer geringen Größe deutlich früher eluierte als GST (12.5 min bzw. 20 min). Durch Massenspektrometrie konnten die korrekten Molekulargewichte der isolierten WW-Domänen-Varianten verifiziert werden (siehe Tabelle 21 im Anhang).



**Abbildung 17:** RP-HPLC-Auftrennung von isolierter WW-wt-Domäne und GST nach der proteolytischen Spaltung durch Thrombin im Gradient (gestrichelte Linie) von 0-65% Acetonitril (Säule: SOURCE15-RPC, Auftrag entspricht 40 µg Fusionsprotein GST-WW). Das HPLC-Protokoll zur Reinigung der isolierten WW-Domäne ist in Tabelle 5 angegeben.

Da sowohl Acetonitril stark denaturierend wirkt, als auch der TFA-Anteil in der mobilen Phase einen pH-Wert von etwa 2 bewirkt, mußte davon ausgegangen werden, daß die WW-Domäne mit dieser Methode im entfalteten Zustand gewonnen wurde. Erst durch Abziehen der flüchtigen Bestandteile des Lösungsmittels (Acetonitril, TFA), Lyophilisation (Abschnitt II.10.9) und nachfolgende Resuspension in einen geeigneten Puffer (z.B. 'WW-Puffer TA') wurde die WW-Domäne wieder in den nativen Zustand überführt, was durch CD-Spektroskopie (Abschnitt III.1.3.2), NMR-Messungen (Abschnitte III.1.3.3 und III.2.3) sowie Bindungsstudien (Abschnitt III.1.5) belegt werden konnte. Nach der Reinigung und proteolytischen Spaltung von 264 mg GST-WW verblieben 35 mg gereinigte, lyophilisierte WW-Domäne. Das entsprach einer Ausbeute von 6.25 mg je Liter Anzuchtvolumen.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte RP-HPLC-Strategie konnte zur Reinigung sämtlicher WW-Varianten angewendet werden und stellte eine Alternative zu bisher beschriebenen Verfahren dar, in denen WW-Domänen vorwiegend synthetisch (Camarero et al., 1998; Toepert et al., 2001; Otte et al., 2003) oder durch rekombinante Expression als Fusionsprotein und Isolierung der abgespaltenen WW-Domäne mittels Gelfiltration gewonnen wurden (Macias et al., 1996; Koepf et al., 1999b; Bayer et al., 2003). Neuere Arbeiten dagegen involvieren ebenfalls das hier angewendete Reinigungsschema (Kanelis et al., 2001; Kato et al., 2004).

### III.1.3. Spektroskopische Eigenschaften

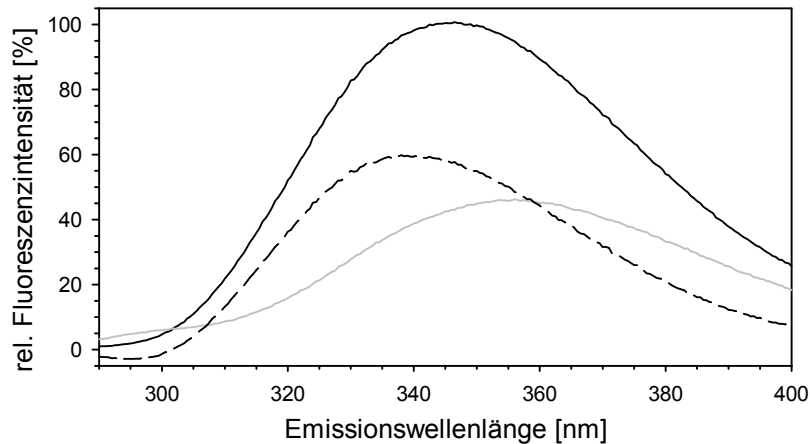
#### III.1.3.1. Fluoreszenz

Die isolierte WW-Domäne 1 aus FBP11 verfügt neben den beiden namensgebenden Tryptophanen W17 und W39 über drei Tyrosine und weist dadurch distinkte Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften im UV-Bereich auf (errechneter molarer Extinktionskoeffizient:  $\epsilon_{280}=15470 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten Varianten WW-AKSM, WW- $\Delta ket$ , WW-D24C und WW-K35C wiesen in Bezug auf die Fluoreszenz ein identisches Verhalten auf. Nachfolgend wird daher exemplarisch auf WW-wt eingegangen.

Die native WW-Domäne zeigte bei Anregung der Tyrosin- und Tryptophanseitenketten (280 nm) ein Maximum der Fluoreszenzintensität bei 347 nm, während das Maximum der in 6 M GdnHCl



denaturierten WW-Domäne rot-verschoben bei 357 nm lag und eine etwa um die Hälfte verringerte Amplitude aufwies (Abbildung 18).

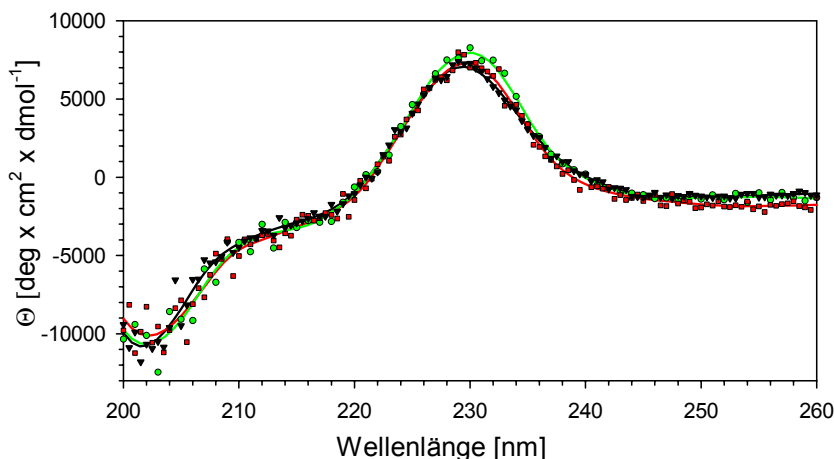


**Abbildung 18:** Fluoreszenzemissionsspektren von 2.5  $\mu$ M isolierter WW-wt in 'WW-Puffer TA' (nativ, schwarz durchgezogene Linie) bzw. 'WW-Puffer TA + 6 M GdnHCl' (denaturiert, grau durchgezogene Linie) aufgenommen bei 25°C, Anregung bei 280 nm, die schwarz gestrichelte Linie repräsentiert das Differenzspektrum.

Die Fluoreszenz der aromatischen Seitenketten kann als empfindlicher Indikator für Änderungen in ihrer unmittelbaren chemischen Umgebung angesehen werden. Die bei der Proteinfaltung beobachtete Verschiebung des Intensitätsmaximums in Richtung größerer Wellenlänge (als auch die Änderung der Amplitude) resultiert im Allgemeinen aus der zunehmenden Exposition der aromatischen Seitenketten eines entfalteten Proteins gegenüber dem Lösungsmittel. Proteine in nativer Faltung dagegen zeigen oft ein Fluoreszenzmaximum im Bereich zwischen 320 und 340 nm, ein Indiz dafür, daß die aromatischen Aminosäuren üblicherweise im relativ hydrophoben Inneren der Proteine verborgen sind (Holtzhauer, 1996). Die isolierte WW-Domäne zeigte im nativen Zustand bereits eine geringe Rotverschiebung des Maximums, eine Tatsache, die sowohl aus der geringen Größe des Moleküls (kein ausgeprägter hydrophober Kern) als auch der partiellen Lösungsmittlexposition der Tryptophane resultiert (Macias et al., 1996; Koepf et al., 1999b). Entfaltungsübergänge zur Untersuchung der Stabilität der isolierten WW-Domäne wurden beim Maximum des Differenzspektrums (340 nm) verfolgt (Abschnitt III.1.4.1).

### III.1.3.2. Circular dichroismus

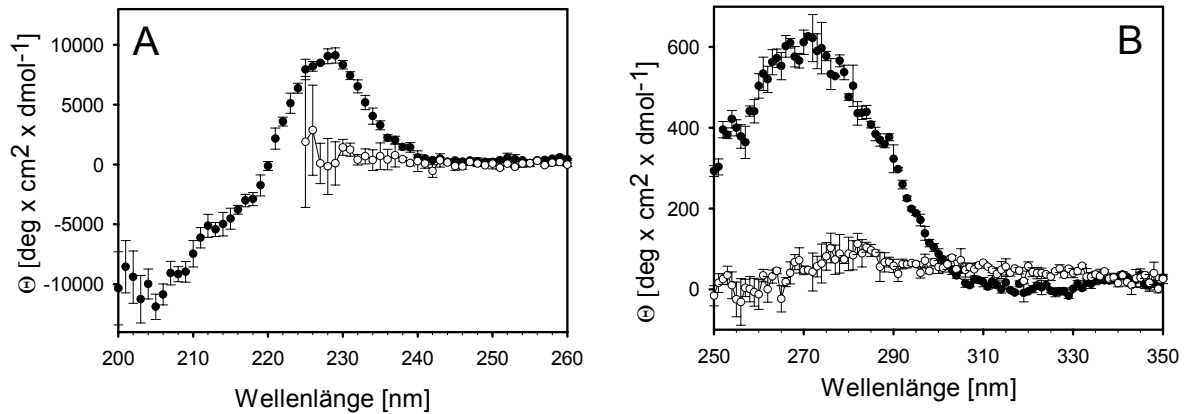
Um Aussagen über die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der isolierten WW-Domäne treffen zu können, wurden die WW-Varianten zunächst der Fern-UV-CD-Spektroskopie unterzogen. Dabei zeigten die Varianten WW-wt, WW-AKSM und WW- $\Delta kt$  nahezu identische Fern-UV-CD-Spektren, die ein ausgeprägtes Maximum mit positiver Elliptizität bei 230 nm aufwiesen und im Bereich unterhalb von 225 nm deutlich negative Elliptizitäten zeigten mit einem Minimum bei 202 nm (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Fern-UV-CD-Spektren von 25  $\mu$ M WW-wt (schwarz), WW-AKSM (grün) und WW- $\Delta ket$  (rot) in 'WW-Puffer P-FL' aufgenommen in einer 1mm-Küvette (10 Akkumulationen, Integrationszeit: 1 s)

WW-Domänen weisen unter nativen Bedingungen eine charakteristische 3-strängige, antiparallele  $\beta$ -Faltblatt-Struktur auf (Macias et al., 1996; Zarrinpar & Lim, 2000). Die vorliegenden Fern-UV-CD-Spektren zeigen jedoch nicht die klassischen  $\beta$ -Faltblatt-Merkmale, die mit einem negativen Peak bei 217 nm und einem positiven Signal bei 196 nm beschrieben sind (Manning & Woody, 1987; Woody, 1993). Aufgrund der negativen Elliptizität um 200 nm ähneln sie eher Spektren weniger geordneter Strukturen (*random coil*, Fasman, 1996). Das Maximum bei 230 nm wird dem Beitrag der aromatischen Aminosäuren (Trp, Tyr) zugeschrieben (Johnson, Jr., 1988; Woody, 1994; Krittanaï & Johnson, 1997) und wurde als auffälligstes Merkmal der Fern-UV-CD-Spektren von isolierten WW-Domänen beschrieben (Koepf et al., 1999b). Der Bereich negativer Elliptizität um 202 nm ist außerdem konsistent mit Fern-UV-CD-Spektren verschiedener kleiner, strukturell charakterisierter Protein-Domänen, die ebenfalls  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aufweisen (z.B. SH3-Domänen und *E.coli* CspA). Deren N- und C-Termini sind als unstrukturiert beschrieben und erklären damit zumindest teilweise die CD-Spektren, die auch *random coil*-Merkmale aufweisen. (Viguera et al., 1994; Knapp et al., 1998; Reid et al., 1998).

Das Nah-UV-CD-Spektrum der isolierten WW-Domäne zeigte ein Signal positiver Elliptizität um 270 nm (Abbildung 20 B), wie es ebenfalls für isolierte WW-Domänen beschrieben wurde (Koepf et al., 1999b; Santiveri et al., 2004). Auch dieses Signal läßt sich anhand der Abundanz aromatischer Aminosäuren sowie ihrer räumlichen Orientierung zueinander erklären (Strickland, 1974; Fasman, 1996) und ist ein Hinweis auf ihre Anordnung im antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt und damit ein weiteres Indiz für die korrekte Faltung der isolierten FBP11-WW1-Domäne.

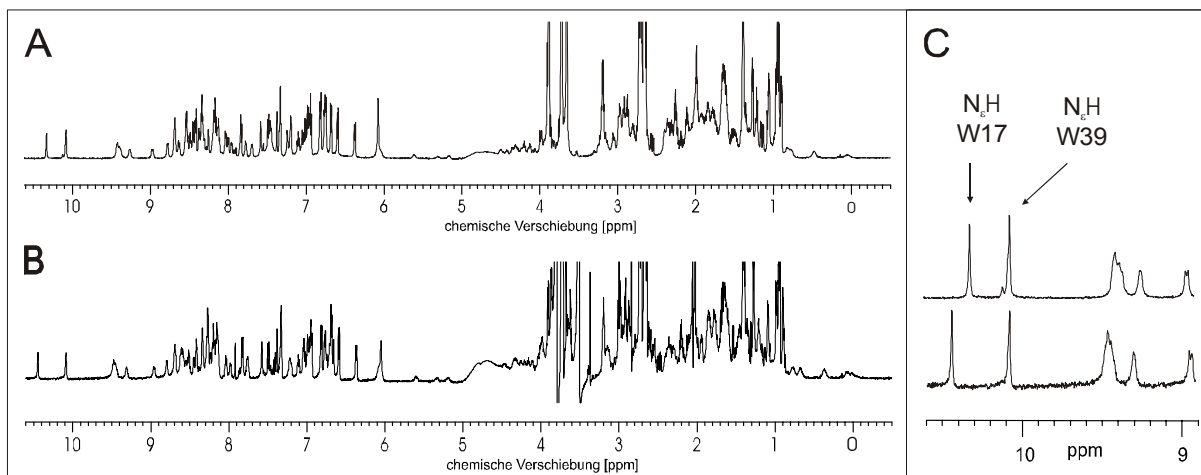


**Abbildung 20:** CD-Spektren von 45  $\mu\text{M}$  nativer (●) und durch 6 M GdnHCl denaturierter (○) WW-AKSM in 'WW-Puffer P-FL'. **(A)** Fern-UV-CD-Spektren aufgenommen in einer 1 mm-Küvette **(B)** Nah-UV-CD-Spektren aufgenommen in einer 1cm-Küvette (3 Akkumulationen, Integrationszeit 5 Sekunden). Das starke Ansteigen der Dynodenspannung bei Wellenlängen  $< 220$  nm während der Messungen in Gegenwart von 6M GdnHCl verhinderte die Aufnahme des kompletten Fern-UV-CD-Spektrums der denaturierten WW-Domäne in diesem Wellenlängenbereich

Im Vergleich der CD-Spektren von nativer und durch 6M GdnHCl denaturierter WW-Domäne wurde das Verschwinden des Fern-UV-CD-Signals bei 230 nm sowie des Nah-UV-CD-Signals um 270 nm im Spektrum der entfalteten Domäne beobachtet (Abbildung 20). Aufgrund des deutlich höheren Signalunterschieds im Fern-UV-Bereich, wurden Entfaltungsübergänge CD-spektrometrisch bei 230 nm verfolgt (Abschnitte III.1.4.1 und III.1.4.2).

### III.1.3.3. <sup>1</sup>H-NMR

Die Aufnahme von homonuklearen, eindimensionalen <sup>1</sup>H-NMR-Spektren erlaubte eine detailliertere Analyse der Sekundär- und Tertiärstruktur und wurde für die Varianten 'WW-wt' und 'WW-AKSM' durchgeführt. Die dabei erhaltenen Spektren (Abbildung 21) zeigen eine gute Signaldispersion speziell im Bereich der Amid-Protonen zwischen 8.5 und 9.5 ppm (siehe Abschnitt II.12.12, Tabelle 9) sowie scharfe Peaks über den gesamten Bereich des Spektrums - ein deutliches Indiz für den gefalteten Zustand der isolierten WW-Varianten (Macias et al., 1996). Dafür sprechen weiterhin die hochfeldverschobenen Signale von Protonen aliphatischer Gruppen ( $< 1$  ppm), die diese in definierter Tertiärstruktureinbettung zeigen. Basis für diese Verschiebung ist der Ringstrom benachbarter aromatischer Aminosäuren in der asymmetrischen Umgebung, die ein Protein darstellt (Wüthrich, 1986).



**Abbildung 21:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren vom 1 mM WW-wt (**A**) und WW-ASKM (**B**) in 'WW-Puffer P-NMR' in Gegenwart von 10%  $\text{D}_2\text{O}$  (v/v) bei 25°C. Das  $^1\text{H}$ -Signal des Lösungsmittels Wasser (Bereich um 4.7 ppm) wurde durch Einstrahlung auf der Wasserfrequenz (Sättigung) unterdrückt. Im Ausschnitt des Spektrums von 9-10.5 ppm (**C**) sind die Signale der indolischen  $\text{N}_\epsilon\text{H}$ -Protonen der beiden Tryptophane W17 und W39 von WW-wt (oben) und WW-AKSM (unten) gekennzeichnet (Pfeile, Zuordnung nach Macias et al., 1996)

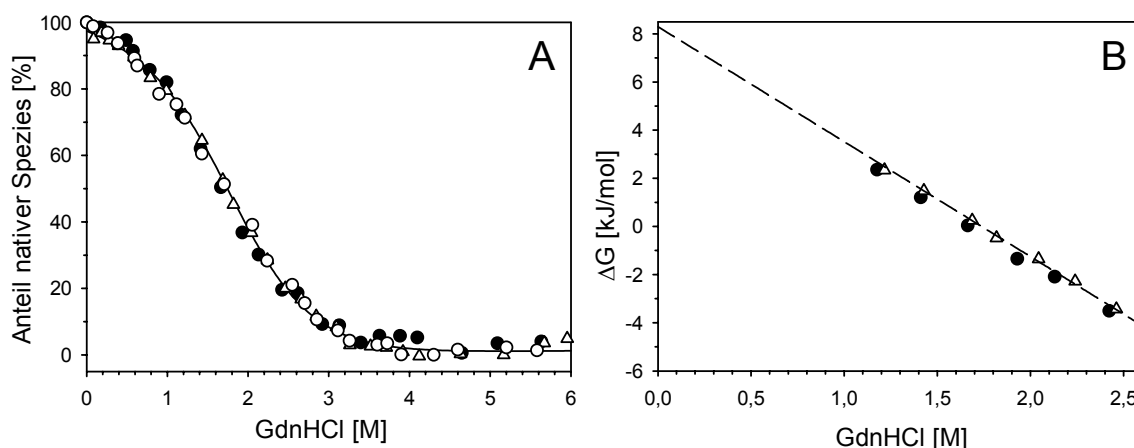
Ein charakteristisches Merkmal der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von isolierten WW-Domänen sind die beiden  $\text{N}_\epsilon\text{H}$ -Signale der Tryptophane W17 und W39 (Abbildung 21 C), die chemische Verschiebungen um 10 ppm zeigen. Das W17- $\text{N}_\epsilon\text{H}$ -Signal der Variante WW-AKSM (10.5 ppm) unterschied sich dabei in der Verschiebung vom gleichen Signal der Variante WW-wt (10.3 ppm). Diese Beobachtung war nicht überraschend, da sie mit dem Vorhandensein der vier zusätzlichen Aminosäuren AKSM in der unmittelbaren Nachbarschaft des N-terminalen W17 von WW-AKSM korrelierte. Sowohl die Tieffeldverschiebung als auch die Dispersion der beiden indolischen NH-Signale relativ zueinander sind weitere Hinweise darauf, daß WW-wt und WW-AKSM in sehr ähnlicher Art und Weise die typische WW-Domänen-Faltungstopologie aufweisen (Macias et al., 1996; Koepf et al., 1999a; Koepf et al., 1999b).

### III.1.4. Stabilität der isolierten WW-Domäne

#### III.1.4.1. Stabilität gegenüber Guanidiniumhydrochlorid

Der Einfluß des Denaturierungsmittels Guanidiniumhydrochlorid ( $\text{GdnHCl}$ ) auf die Struktur der isolierten WW-Domäne wurde mittels Messungen der Fluoreszenz- und des Circular dichroismus analysiert. Wie zuvor analysiert, zeigte die durch 6M  $\text{GdnHCl}$  entfaltete WW-Domäne eine um etwa 50% verringerte Fluoreszenzintensität bei 340 nm im Vergleich zur gefalteten Spezies (Abschnitt III.1.3.1). Außerdem geht die chemisch induzierte Entfaltung mit dem Verlust des charakteristischen Maximums im Fern-UV-CD-Spektrum bei etwa 230 nm einher (Abschnitt III.1.3.2). Diese spektroskopischen Eigenschaften wurden genutzt, um Entfaltungs- sowie Rückfaltungsübergänge der isolierten WW-Domäne, am Beispiel von WW-AKSM, aufzunehmen, aus denen sich die freie Stabilisierungsenergie der gefalteten WW-Domäne bestimmen läßt (Pace & Scholtz M.J., 1997).

Die chemisch induzierte Entfaltung von WW-AKSM zeigt einen einzelnen, reversiblen Übergang; die Übergänge von De- und Renaturierung erwiesen sich als nahezu deckungsgleich (Abbildung 22 A).



**Abbildung 22:** (A) Normalisierte GdnHCl-induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge der isolierten WW-Domäne aufgenommen bei 25°C: Entfaltung (●) und Rückfaltung (○) von 1.6 μM WW-AKSM verfolgt über Fluoreszenz bei 340 nm in 'WW-Puffer P-FL' in Gegenwart der jeweiligen GdnHCl-Konzentration, sowie Entfaltung von 45 μM WW-AKSM verfolgt über Fern-UV-Circulardichroismus bei 230 nm (Δ) unter gleichen Pufferbedingungen. Die nicht-lineare Anpassung der Daten erfolgte nach Santoro & Bolen, 1988. (B) Auswertung der Entfaltungsübergänge durch Linearisierung nach Pace, 1986. Dazu wurden nur die Messpunkte des annähernd linearen Übergangsbereiches (1.1 bis 2.6 M GdnHCl) verwendet.

Bemerkenswert war auch, daß die Verfolgung von Fluoreszenz und Circulardichroismus identische Übergänge lieferten, was sich damit erklären läßt, daß in beiden Messungen entfaltungsbedingte Veränderungen der strukturellen Umgebung aromatischer Aminosäuren (Trp, Tyr) erfaßt werden, die für die Fluoreszenz bei 340 nm als auch die positive Elliptizität bei 230 nm verantwortlich sind (siehe auch Abschnitt III.1.3.2). Merkmal der Übergänge war auch das Fehlen eines ausgeprägten Plateaus bei niedrigen GdnHCl-Konzentrationen, indikativ für eine relativ geringe Stabilität des nativen Zustandes. Im Gegensatz dazu steht der relativ breite Übergang beginnend bei GdnHCl-Konzentrationen kleiner als 0.5 M bis etwa 3.5 M GdnHCl mit einem Übergangsmittelpunkt  $D_{1/2}$  von etwa 1.8 M GdnHCl. Diese Tatsache wurde so interpretiert, daß die strukturellen Änderungen bei der Entfaltung eher unkooperativ stattfinden und kein definierter Punkt existiert, an dem die Struktur "kollabiert". Diese Beobachtung ist auch für andere WW-Domänen beschrieben und charakteristisch für isolierte Proteindomänen geringer Größe, deren Stabilisierung vergleichsweise wenig strukturbildende Wechselwirkungen zugrunde liegen (Reid et al., 1998; Koepf et al., 1999b; Nguyen et al., 2003; Jäger et al., 2001)

**Tabelle 11:** Vergleich der freien Stabilisierungsenergie ( $\Delta G_{D \rightarrow N}$ ) der isolierten WW-Domäne WW-AKSM, Kooperativitäten ( $m$ , Maß für den Unterschied in der Lösungsmittel-exponierten Oberfläche zwischen denaturiertem und nativen Zustand) der Übergänge (Abbildung 22) und GdnHCl-Konzentrationen des Übergangsmittelpunktes ( $D_{1/2}$ ) ermittelt anhand verschiedener Mess- und Auswertungsverfahren.

Prinzip der Messung	$\Delta G_{D \rightarrow N}$ [kJ/mol] <sup>1</sup>	Kooperativität $m$ [kJ/mol / M <sub>GdnHCl</sub> ] <sup>1</sup>	$D_{1/2}$ [M]	$\Delta G_{D \rightarrow N}$ [kJ/mol] <sup>2</sup>
Circulardichroismus	$-8.6 \pm 1.4$	$5.0 \pm 0.4$	$1.8 \pm 0.1$	$-7.9 \pm 3.5$
Fluoreszenz	$-8.9 \pm 0.3$	$4.9 \pm 0.1$	$1.8 \pm 0.1$	$-8.3 \pm 3.2$

<sup>1</sup> ausgewertet nach Santoro & Bolen, 1988, siehe Abschnitt II.12.7

<sup>2</sup> ausgewertet nach Pace, 1986, siehe Abschnitt II.12.7

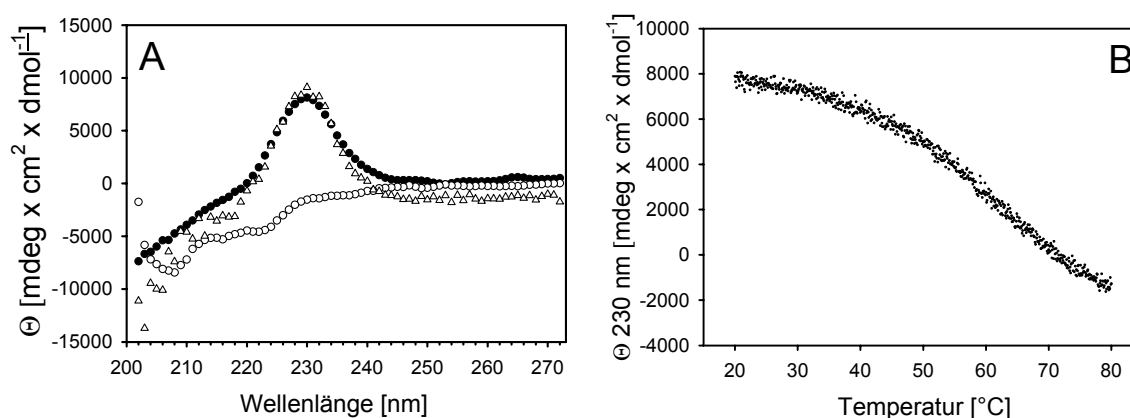
Eine quantitative Aussage über die Stabilität von FBP11-WW1 ließ sich anhand numerischer Auswertung der GdnHCl-induzierten Entfaltungsübergänge treffen. Wie aus Tabelle 11 ersichtlich führten die verschiedenen Methoden der Messung und Auswertung (Abschnitt II.12.7) dabei zu ähnlichen Ergebnissen. Die durchschnittliche freie Stabilisierungsenergie lag mit -8.5 kJ/mol für WW-AKSM im oberen Bereich der Energien, die unter ähnlichen Bedingungen für

andere isolierte WW-Domänen bestimmt wurden (hYAP-WW: -4.3 kJ/mol, WW-Prototyp: -5.6 kJ/mol, FBP28-WW: -8.3 kJ/mol, Pin1-WW: -8.7 kJ/mol, Koepf et al., 1999b; Ferguson et al., 2001a; Deechongkit & Kelly, 2002). Ähnliche Beträge wurden auch für andere kleine  $\beta$ -Faltblattproteine ermittelt (z.B. CspA: -12.5 kJ/mol, Reid et al., 1998).

### III.1.4.2. Thermische Stabilität

Analog zur Analyse der Stabilität gegenüber chemischer Denaturierung (Abschnitt III.1.4.1) wurde das Verhalten der isolierten WW-Domäne bei der thermischen Denaturierung zunächst durch Verfolgung der intrinsischen Fluoreszenzemission bei 340 nm analysiert. Dabei wurde eine nahezu lineare Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Temperaturerhöhung von 20°C auf 80°C festgestellt, in der kein temperaturinduzierter Entfaltungsschritt detektiert werden konnte (nicht gezeigt). Da die Fluoreszenzintensität *per se* mit zunehmender Temperatur linear abnimmt, konnte dieses Signal nicht mit der Entfaltung der WW-Domäne korreliert werden.

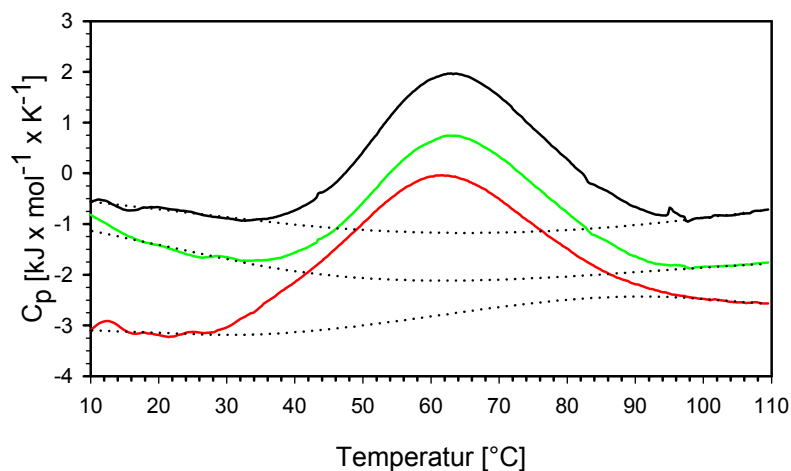
Als geeigneter erwies sich, die temperaturabhängige Signaländerung im Circular dichroismus, da sich die Fern-UV-CD-Spektren der nativen und denaturierten WW-Domäne in ihrer Elliptizität bei 230 nm deutlich unterschieden. Dabei zeigte sich, daß die thermische Denaturierung aller Wahrscheinlichkeit nach reversibel verläuft, gekennzeichnet durch die Rückkehr der charakteristischen, positiven Absorptionsbande nach Abkühlung der Probe von 80°C auf 20°C (Abbildung 23 A). Der Verlauf des Entfaltungsübergangs war durch einen kontinuierlichen Signalabfall gekennzeichnet, der bereits zwischen 20-30°C einsetzte, bei Temperaturen um 40°C deutlicher wurde (nicht-lineare Änderung) und zum Ende der Messung (80°C) offensichtlich noch nicht beendet war (Abbildung 23 B). Aggregation wurde nicht festgestellt.



**Abbildung 23:** Thermische Entfaltung der isolierten WW-Domäne verfolgt über die Änderung des Circular dichroismus. **(A)** Fern-UV-CD-Spektren von 25  $\mu$ M WW-AKSM in 'WW-Puffer P-FL' bei 20°C (●), bei 80°C (○) sowie nach Abkühlung von 80°C auf 20°C (▽). **(B)** Verlauf der Elliptizität bei 230 nm während der thermischen Entfaltung von 25  $\mu$ M WW-AKSM in 'WW-Puffer P-FL' in Abhängigkeit von der Temperatur (20°C bis 80°C, Heizrate 1K/min, Messintervall: 5 s). Die Messungen wurden in einer 1mm Küvette aufgenommen.

Um die thermische Denaturierung über einen größeren Temperaturbereich beobachten zu können, wurde als alternative Methode *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) angewendet, bei der Messungen unter erhöhtem Druck möglich sind und damit den Messbereich auf Temperaturen über 100°C erweitern. Es wurde das Verhalten der Varianten WW-wt, WW-AKSM und WW- $\Delta$ ket während der thermischen Denaturierung im Bereich von 10°C bis 110°C untersucht. Abbildung 24 zeigt die aufgenommenen Aufheizkurven, die alle einen ähnlichen Verlauf aufwiesen. Die Orientierung der beobachteten Maxima in Richtung positiver Ordinatenwerte ist charakteristisch für den endothermen Prozeß der Proteindenaturierung. Die jeweils variable Verschiebung der Kurven in Ordinatenrichtung kann sowohl von Fehlern bei der Konzentrationsbestimmung der

WW-Varianten als auch von Abweichungen des genau einzustellenden Probenvolumens in der Meßzelle herrühren.

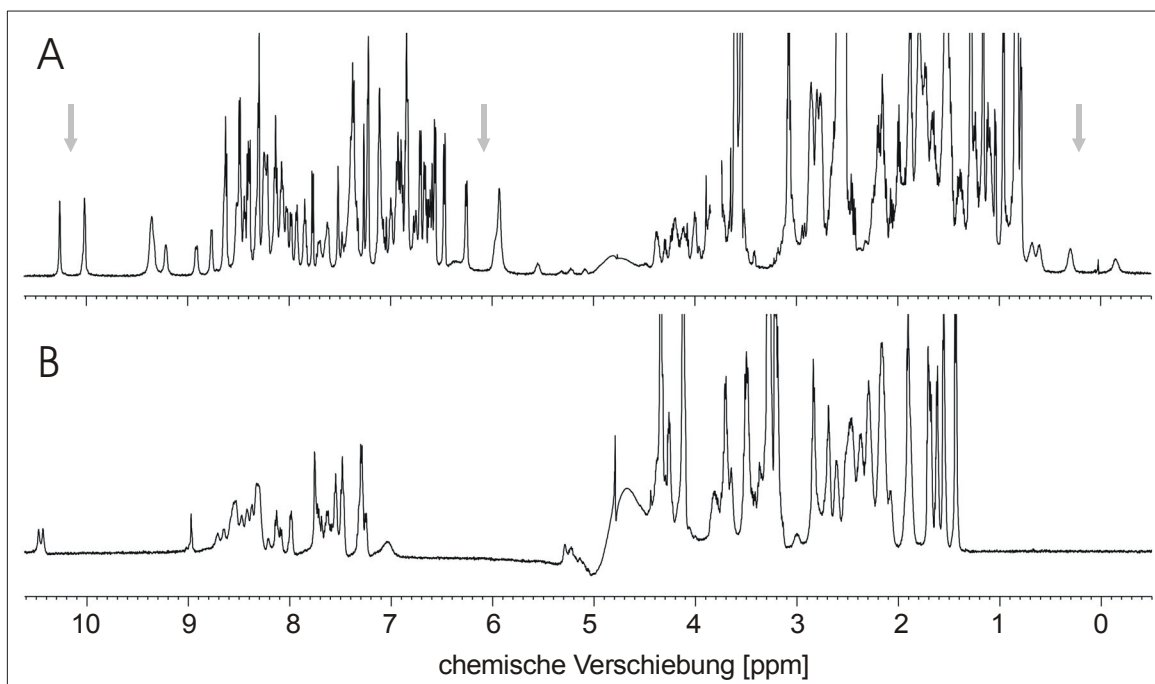


**Abbildung 24:** Thermogramme des Entfaltungsüberganges der Varianten WW-wt (grün), WW-AKSM (schwarz) und WW- $\Delta kt$  (rot). Gezeigt sind die Aufheizkurven (Heizrate 1°C/min) von 110  $\mu\text{M}$  Protein der jeweiligen Variante in 'WW-Puffer P-FL'. Die gestrichelten Linien stellen die angepassten Basislinienverläufe dar.

Aus den Aufheizkurven wurde ein breiter Temperaturbereich des Übergangs (35°C bis 95°C) deutlich, wobei Variante WW- $\Delta kt$  bei etwas tieferen Temperaturen zu entfalten scheint. Weiterhin kann angenommen werden, daß die WW-Domänen erst zwischen 95°C und 100°C vollständig entfaltet vorliegt, wie bereits anhand der CD-Analysen vermutet wurde. Einen wesentlichen Aspekt bei der Auswertung der Übergänge stellte die Anpassung der Basislinien der Thermogramme dar, da sich aus dieser Festlegung direkt der Temperaturbereich des Übergangs ergibt. Aufgrund des breiten Übergangs und der relativ niedrigen Entfaltungsenthalpien ( $\Delta H$ ) von WW-Domänen allgemein (Ferguson et al., 2001a) gestaltete sich die Definition der Basislinien jedoch als schwierig und ist dementsprechend fehlerbehaftet (Abbildung 24). Aus diesem Grund wurde von der Bestimmung von  $\Delta H$  abgesehen. Unter Annahme eines symmetrischen Verlaufs der Übergänge wurden die Übergangsmittelpunkte ( $T_m$ ) der thermischen Entfaltung mit 63°C für WW-wt und WW-AKSM sowie 61°C für WW- $\Delta kt$  bestimmt. Der um 2°C verringerte  $T_m$  letzterer Variante spricht für eine leichte Destabilisierung von WW- $\Delta kt$  im Vergleich zu den übrigen Varianten und könnte ggf. auf einen stabilisierenden Einfluß der N-terminalen Kinase-Erkennungssequenz in den Varianten WW-wt und WW-AKSM zurückzuführen sein.

In den DSC-Messungen zeigte sich zumindest teilweise die Reversibilität der thermischen Denaturierung der WW-Domänen. Allerdings wurde beim wiederholten Aufheizen der Probe nicht mehr die ursprüngliche Amplitude des Signals im Übergang erreicht (Daten nicht gezeigt). Ursache dafür kann die Beeinträchtigung der Rückfaltung durch irreversible, chemische Modifikation (z.B. Deaminierung) sein, die unter hohen Temperaturen vermehrt auftritt. Eine Aggregation wurde dagegen nicht festgestellt.

Die Aufnahme von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der isolierten WW-Domäne bei Temperaturen von 15°C bis 75°C (dem technischen Maximum des NMR-Probenkopfes) erlaubte eine Verfolgung distinkter Protonensignale im Verlauf der temperaturinduzierten Entfaltung der Variante WW-wt. Die Spektren von nativer (15°C) und (vermutlich partiell) entfalteter WW-Domäne (75°C) zeigen dabei deutliche Unterschiede in der Anzahl und Verteilung der Signale (Abbildung 25).

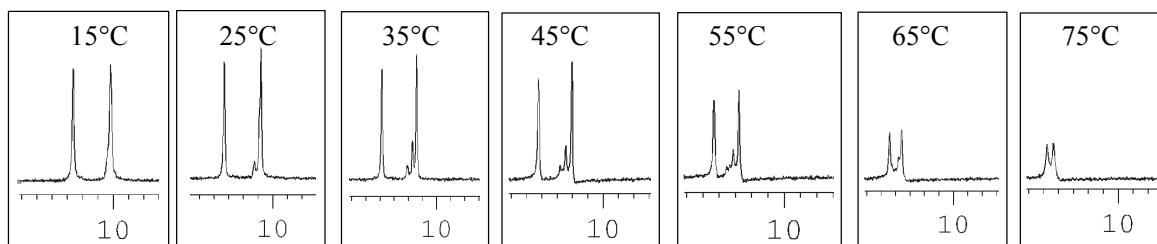


**Abbildung 25:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von 1 mM WW-wt in 'WW-Puffer P-NMR' bei (A)  $15^\circ\text{C}$  und (B)  $75^\circ\text{C}$ . Im Vergleich der Spektren ergaben sich eine Vielzahl Unterschiede, besonders deutlich waren die Abnahme der Signaldispersion sowie das Verschwinden einiger Signale (Pfeilmarkierungen). Das Spektrum der abgekühlten Probe entsprach Spektrum A (Rückfaltung).

Es wurde eine allgemeine Abnahme der Signaldispersion im Spektrum beobachtet. Besonders auffällig war das Verschwinden der hochfeldverschobenen Signale von Protonen aliphatischer Gruppen (0-1.2 ppm), von Seitenketten-NH (um 6 ppm) sowie vieler Signale im Bereich von 6 - 9.5 ppm, der sowohl Peptidrückgrat-NH als auch Aromaten-gebundene Protonen gefalteter Proteinen umfasst (siehe Tabelle 9, Abschnitt II.12.12, Wüthrich, 1986). Ebenso wurde eine Signalverschiebung der  $\text{N}_\epsilon$ -Protonen von W17 und W39 (bei 10 ppm) in Richtung Tieffeld sowie eine Angleichung der chemischen Verschiebung beider Signale bei  $75^\circ\text{C}$  beobachtet. Letzteres deutet darauf hin, daß unter diesen Bedingungen (partielle Entfaltung) beide Protonen weniger abgeschirmt werden und sich in ähnlicher chemischer Umgebung befinden, was im nativen Zustand nicht der Fall ist. Abbildung 26 zeigt eine genauere Analyse der chemischen Verschiebungen der beiden Protonensignale in Abhängigkeit von der Temperatur. Dabei wurde die Migration der Signale bereits bei  $25^\circ\text{C}$  detektiert, ihre Amplitude war jedoch erst bei  $45^\circ\text{C}$  deutlich verringert. Weiterhin spaltete sich das Signal von W39- $\text{N}_\epsilon\text{H}$  in mehrere Peaks auf, was für W17- $\text{N}_\epsilon\text{H}$  nicht beobachtet wurde. Dieses Verhalten spricht für die Existenz von alternativen Faltungszuständen der WW-Domäne (z.B. partiell entfaltete Spezies), die bei höheren Temperaturen zunehmend populiert werden. Interessanterweise scheinen die damit einhergehenden strukturellen Veränderungen zunächst in der Umgebung von W39- $\text{N}_\epsilon\text{H}$  stattzufinden, während W17- $\text{N}_\epsilon\text{H}$  davon relativ unbeeinflusst bleibt.

Nach Abkühlung ( $25^\circ\text{C}$ ) der zuvor denaturierten WW-Domäne ( $75^\circ\text{C}$ ) konnte erneut ein NMR-Spektrum aufgenommen werden, das identisch mit dem der nativen WW-Domäne war (Abbildung 25A). Ebenso war keine Aggregation des Proteins festzustellen, daher wurde von Reversibilität der thermischen Entfaltung (zumindest bis  $75^\circ\text{C}$ ) ausgegangen.





**Abbildung 26:** Änderung der chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ -NMR-Signale der  $\text{N}_\text{H}$ -Protonen der beiden Tryptophane W17 und W39 (10.25 ppm bzw. 10.05 ppm bei 15°C) in Abhängigkeit von der Temperatur (Ausschnitt aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum: 9.7-10.6 ppm, 1 mM WW-wt in 'WW-Puffer P-NMR').

Mit Hilfe der hier angewendeten Meßverfahren (CD, DSC, NMR) ließ sich das Verhalten der isolierten WW-Domäne FBP11-WW1 bei der thermisch induzierten Entfaltung analysieren. In Übereinstimmung zeigte sich eine reversible Entfaltung in einem relativ breiten Temperaturbereich des Überganges, der bereits bei etwa 35°C einsetzte und erst bei Temperaturen um 95°C abgeschlossen schien. Aus diesem Grund konnten mittels CD- und NMR-Spektroskopie die Übergänge nur unvollständig dokumentiert werden. Beide Methoden wiesen jedoch darauf hin, daß die WW-Domäne bereits bei Erhitzung bis 80°C einen signifikanten Anteil Sekundär- und Tertiärstruktur verloren hat. Aus der DSC-Analyse ergaben sich  $T_m$ -Werte von durchschnittlich 62°C, wobei sich die analysierten Varianten (WW-wt, WW-AKSM, WW- $\Delta k\epsilon t$ ) nicht wesentlich unterschieden.

Analysen der thermischen Stabilität von anderen WW-Domänen beschreiben oftmals ein sehr ähnliches Verhalten der Domänen, obwohl auch Unterschiede in den beobachteten Stabilitäten vorhanden sind. So zeigt z.B. hYAP65-WW, das ebenfalls reversibel thermisch entfaltet, eine geringere Stabilität ( $T_m \sim 43^\circ\text{C}$ , Koepf et al., 1999b; Ferguson et al., 2001a). Im Gegensatz dazu sind für hPin1WW und FBP28WW mit FBP11-WW1 vergleichbare Stabilitäten ( $T_m \sim 60^\circ\text{C}$ ) beschrieben worden (Ferguson et al., 2001a; Jäger et al., 2001). Daneben zeigte FBP28WW einen Trend zur Fibrillenbildung unter höheren Proteinkonzentrationen, die für FBP11-WW1 nicht beobachtet wurde (Ferguson et al., 2003).

### III.1.5. Bindung prolinreicher Liganden

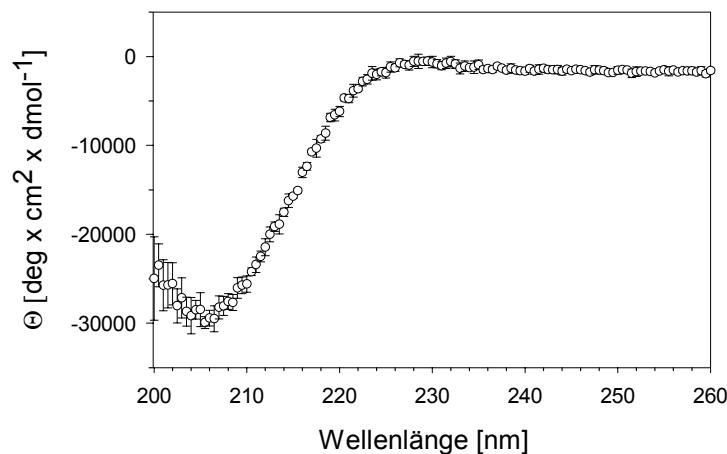
Die Bindungsanalysen der isolierten WW-Domäne wurden in der vorliegenden Arbeit anhand von synthetischen Peptidliganden durchgeführt, die als wesentliches Merkmal mehrere, aufeinander folgende Prolin-Reste enthielten (prolinreiche Liganden). Zusätzlich wiesen sie ein für das FBP11-WW1-Bindemotiv spezifische Leucin sowie ggf. Cystein (zur Disulfidverbrückung) und in einigen Fällen die Aminosäuren Glycin und Serin (als *spacer*) auf. Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Nomenklatur der Peptide ist Tabelle 3 zu entnehmen. Cysteinfreie prolinreiche Peptide erhielten die Bezeichnung PPN, während die davon abgeleiteten cysteinhaltigen Varianten den Präfix PPC erhielten.

#### III.1.5.1. Sekundärstruktur prolinreicher Liganden

Prolinhaltige Sequenzen, die mehr als vier aufeinander folgende Prolin-Reste enthalten, zeigen eine charakteristische Sekundärstruktur: die linksgängige Polyprolin-II-Helix (Williamson, 1994; Stapley & Creamer, 1999). Diese Konformation führt zu einem typischen Fern-UV-CD-Spektrum von prolinreichen Peptiden. Dabei bestehen letztere oft nicht nur ausschließlich aus Prolinresten, sondern enthalten ggf. auch andere Aminosäuren (Manning & Woody, 1991; Rabanal et al., 1993).

Am Beispiel des Peptidliganden GPPPPPPPLP (PPN1) wurde überprüft, ob die FBP11-WW1-Liganden im freien Zustand ebenfalls in der helikalen Polyprolin-II-Konformation vorlagen. Wie

aus Abbildung 27 ersichtlich, zeigte sich im Fern-UV-CD-Spektrum ein ausgeprägtes Minimum um 205 nm und ein schwaches Maximum bei 228 nm. Dieses Verhalten wurde auch z.B. für Deca-L-Prolin ( $P_{10}$ ) sowie mehrere prolinreiche Liganden von SH3-Domänen beschrieben, von denen inzwischen detaillierte Strukturinformationen bekannt sind (Rabanal et al., 1993; Viguera et al., 1994). Die Polyprolin-II-Helix-Konformation ist daher auch für den freien Liganden PPN1 anzunehmen und kann für die davon abgeleiteten Peptidliganden erwartet werden.

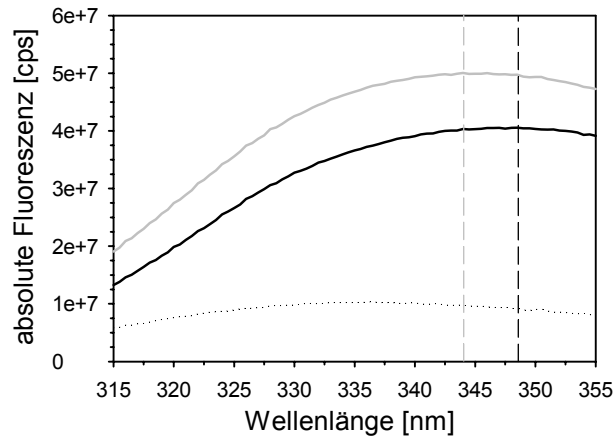


**Abbildung 27:** CD-Spektrum einer 100  $\mu$ M Lösung des prolinreichen Liganden PPN1 in 'WW-Puffer P-FL', gemessen in einer 1mm-Küvette (6 Akkumulationen, Integrationszeit 3 s)

### III.1.5.2. Affinität von FBP11-WW1 zu prolinreichen Liganden

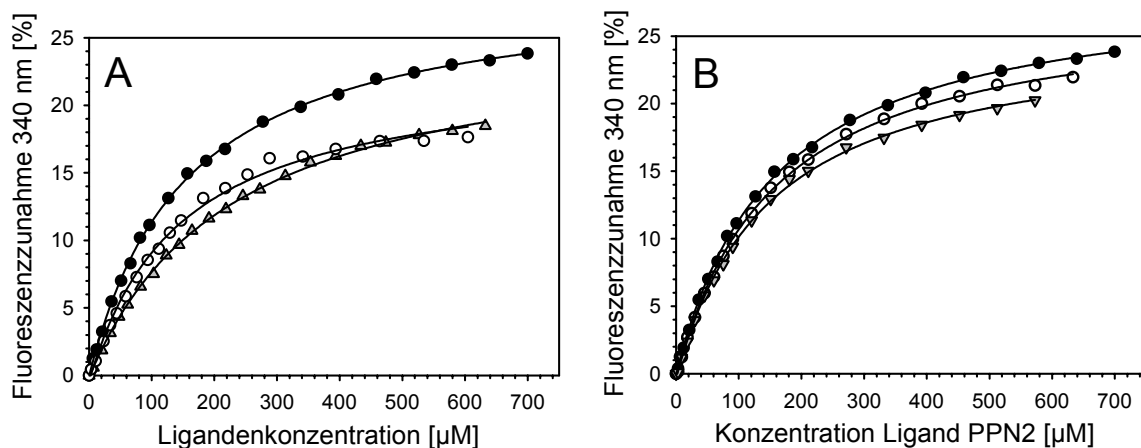
Die hier gezeigten Bindungsanalysen erfolgten anhand der Änderung der intrinsischen Fluoreszenzintensität der WW-Domäne infolge der Zugabe von Peptidliganden (Fluoreszenz-Titration, Abschnitt II.12.2).

Die analysierten prolinreichen Liganden stellen Varianten des Peptides PPPPPPPLPP (in der vorliegenden Arbeit repräsentiert von PPN2 mit N-terminalen  $\beta$ -Ala-Gly) dar, einem Fragment der Proteine WBP-5 und WBP-8A, deren Bindung an FBP11-WW1 gezeigt wurde (Bedford et al., 1997). Da die verwendeten prolinreichen Peptide keine aromatischen Aminosäuren enthielten, konnte die Änderung der bei 295 nm angeregten Fluoreszenz direkt den Tryptophan-Resten der WW-Domäne zugeschrieben werden. So zeigte sich z.B. eine Zunahme der absoluten Fluoreszenzintensität (bei 340 nm) von etwa 25 % infolge der Zugabe des Liganden PPN2 bis zu einer Konzentration von 700  $\mu$ M. Gleichzeitig konnte eine leichte Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums (von 349 nm auf 344 nm) der Tryptophanfluoreszenz in Gegenwart des Liganden beobachtet werden (Abbildung 28). Beides weist auf eine zunehmende Abschirmung der Tryptophan-Seitenketten vom Lösungsmittel hin, wodurch dynamische Quenchvorgänge des angeregten Zustandes stärker unterdrückt werden.



**Abbildung 28:** Fluoreszenzspektren von freier 3.5  $\mu\text{M}$  WW-AKSM (schwarze Linie) und in Gegenwart von 700  $\mu\text{M}$  Ligand PPN2 (graue Linie, Differenzspektrum: gepunktete Linie) bei 25°C in 'WW-Puffer TA'. Die jeweiligen Fluoreszenzmaxima sind durch senkrechte, gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Daß diese Signaländerungen mit der Bindung des Liganden korrelieren, zeigt die Analyse der Abhängigkeit der Fluoreszenz-Intensitätszunahme von der Konzentration des zugesetzten Liganden. Die dabei aufgenommenen Ligandenbindungskurven zeigten ein Sättigungsverhalten, daß sich an ein 1:1 Bindungsmodell anpassen ließ und die Bestimmung von Dissoziationskonstanten des Komplexes aus WW-Domäne und Ligand erlaubte (Abbildung 29).



**Abbildung 29:** Analyse der Bindung von prolinreichen Liganden an die FBP11-WW1-Varianten. Die Analysen erfolgten bei 25°C in 'WW-Puffer TA' (A) unter Verwendung von 3.5  $\mu\text{M}$  WW-AKSM der Liganden PPN1 ( $\Delta$ ), PPN2 ( $\bullet$ ) bzw. PPN3 ( $\circ$ ) oder (B) anhand von 3.5  $\mu\text{M}$  der WW-Varianten WW-wt ( $\circ$ ), WW-AKSM ( $\bullet$ ) bzw. WW- $\Delta\text{ket}$  ( $\nabla$ ) mit dem Ligand PPN2. Die Bestimmung der  $K_D$ -Werte erfolgte anhand der Kurvenanpassungen an ein 1:1 Bindungsmodell.

Dabei wurden für die Liganden PPN1, PPN2 und PPN3 Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) im höher mikromolaren Bereich festgestellt (Tabelle 12). Interessanterweise schien die Amplitude der beobachteten Fluoreszenzzunahme nicht immer mit der Affinität des Liganden zu korrelieren (z.B. PPN2 und PPN3, Abbildung 29 A), ggf. ein Hinweis auf teilweise unterschiedliche mechanistische Details, die der Bindung des jeweiligen Liganden zugrunde liegen. Aufgrund limitierter Verfügbarkeit der Peptidliganden konnten die Bindungskurven weder bis in den Bereich der Sättigung (etwa 10-facher Wert des  $K_D$ , entspräche millimolaren Ligandenkonzentrationen) aufgenommen werden, noch in jedem Fall mehrfach wiederholt werden. Exemplarisch wurde die Reproduzierbarkeit der Bindungsanalysen untersucht, dabei wichen die erhaltenen  $K_D$ -Werte der unterschiedlichen Messungen um weniger als 2%

voneinander ab (Daten nicht gezeigt). Die Korrelationskoeffizienten der Datenanpassungen lieferten jedoch stets Werte über 0,99, daher wurde angenommen, daß die ermittelten  $K_D$ -Werte eine hinreichend genaue Annäherung darstellen. Die relativ geringen Standardfehler der Analysen sind ebenfalls Ausdruck für die gute Beschreibung der Daten durch das 1:1 Bindungsmodell.

**Tabelle 12:** Dissoziationskonstanten der Bindung von FBP11-WW1-Varianten an verschiedene prolinreiche Leucin-Liganden

Ligand	Aminosäure-Sequenz	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ] <sup>1</sup>
PPN1	GPP PPP PPL P	$226 \pm 6$
PPN2	$\beta$ -A GPP PPP PPL PP	$145 \pm 5$
PPN3	$\beta$ -A GPP PPP PPL PPP	$142 \pm 10$
FBP11-WW1-Variante		$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ] <sup>2</sup>
	WW-wt	$152 \pm 3$
	WW-ASKM	$145 \pm 5$
	WW- $\Delta ket$	$148 \pm 4$

<sup>1</sup> Bindung an WW-AKSM mit Standardfehlerangabe, lt. Abbildung 29 A

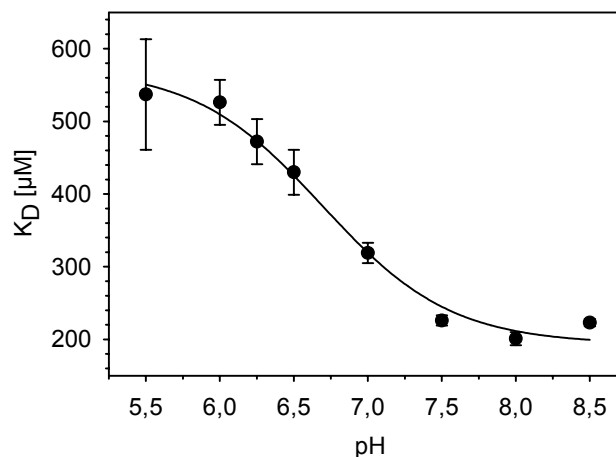
<sup>2</sup> Bindung an PPN2 mit Standardfehlerangabe, lt. Abbildung 29 B

Aus den Bindungsanalysen ergab sich für den Ligand PPN1 eine um etwa 55% verminderte Affinität zu WW-AKSM, während PPN2 und PPN3 sehr ähnliche Dissoziationskonstanten aufwiesen. Die drei Liganden unterschieden sich einerseits in ihren N-terminalen Aminosäuren ( $\beta$ -Alanin im Fall von PPN2 und PPN3), deren Einfluß auf die Bindung jedoch als vernachlässigbar angenommen wurde (Bedford et al., 1997; Otte et al., 2003). Andererseits schien die Anwesenheit von mehr als einem Prolin-Rest nach dem Leucin des Peptidliganden mit einer Erhöhung der Affinität einherzugehen (Tabelle 12). Allerdings unterschieden sich die  $K_D$ -Werte von PPN2 und PPN3 nicht wesentlich, woraus geschlußfolgert wurde, daß das dritte Prolin nach dem Leucin keinen wesentlichen Beitrag zur Bindung liefert. Diese Vermutung wurde anhand der 3D-Struktur des Komplexes aus FBP11-WW1 und dem Ligand PPN4 sowie weiteren Bindungsanalysen bestätigt (Abschnitt III.2.5).

Die ermittelten Dissoziationskonstanten konnten exemplarisch anhand einer zweiten, unabhängigen Bindungsmessung bestätigt werden. Durch Verfolgung der Oberflächenplasmonresonanz (Biacore) infolge der Bindung von WW-wt an den immobilisierten Liganden PPC2 wurde ein  $K_D$ -Wert von  $256 \pm 14 \mu\text{M}$  ermittelt. Dieser Wert liegt in guter Übereinstimmung mit den durch Fluoreszenztitration bestimmten  $K_D$ -Werten von PPN1 ( $226 \pm 6 \mu\text{M}$ ) und PPC2 ( $245 \pm 19 \mu\text{M}$ , Abschnitt III.3.3).

### III.1.5.3. pH-Abhängigkeit der Dissoziationskonstante

Im Rahmen der Charakterisierung der Bindung von isolierter WW-Domäne an prolinreiche Liganden wurde der Einfluß des pH-Wertes des Lösungsmittels (Puffer) auf die Stabilität des Komplexes untersucht. Dazu wurden bei definierten pH-Werten im Bereich von pH 5,5 bis pH 8,5 Dissoziationskonstanten für die Bindung von PPN1 an WW-AKSM bestimmt (Abschnitt II.12.5). Der  $K_D$ -Wert betrug bei pH 5,5 ungefähr das Doppelte des Wertes bei pH 8,5, d.h. die Affinität wurde unter niedrigeren pH-Werten herabgesetzt (Abbildung 30). Die jeweiligen Dissoziationskonstanten sind aus Tabelle 22 (Anhang) ersichtlich.



**Abbildung 30:** Abhängigkeit der Dissoziationskonstante der Bindung vom pH-Wert des verwendeten Puffers. Die Bestimmung der einzelnen  $K_D$ -Werte erfolgte mit  $3.5 \mu\text{M}$  WW-AKSM und dem Ligand PPN1 in 'WW-Puffer PA' ( $< \text{pH } 7$ ) bzw. 'WW-Puffer TA' ( $\geq \text{pH } 7$ ) bei  $25^\circ\text{C}$ . Die Anpassung der Daten erfolgte lt. Abschnitt II.12.5.

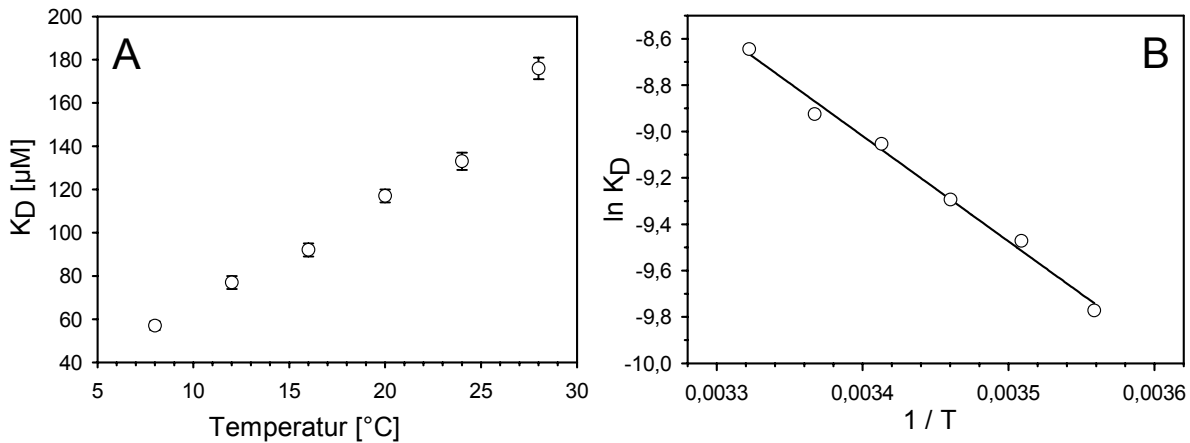
Die sigmoidale Form der Abhängigkeit der beobachteten Affinitäten vom pH ließ dabei auf die Beteiligung einer oder mehrerer ionisierbarer Gruppen an der Bindung schließen, die beim Übergang von pH 8.5 auf pH 5.5 protoniert werden und die Bindung offensichtlich abschwächen. Die mathematische Anpassung der Daten resultierte dabei in einem  $\text{p}K_a$ -Wert von  $6.7 \pm 0.2$ , der den Übergangsmittelpunkt der Protonierung bzw. Deprotonierung beschreibt. Dieser Wert korrespondiert recht gut mit dem in der Literatur tabellierten  $\text{p}K_a$ -Wert der Imidazol-Seitenkette von Histidin, 6.0 im Fall der freien Aminosäure (Harlow & Lane, 1988). Für Histidin im Kontext von Peptiden und Proteinen sind allerdings auch Abweichungen, u.a. auch Verschiebung zu höheren Werten beschrieben (z.B. 6.5, Nozaki & Tanford, 1967). Da FBP11-WW1 nur einen Histidin-Rest aufweist, liegt der Schluß nahe, daß H20 mit deprotonierter Imidazol-Seitenkette an der Bindung entweder direkt beteiligt ist oder indirekt Einfluß hat, indem die protonierte Form von H20 den Komplex zwischen WW-AKSM und PPN1 destabilisiert. Diese Vermutung konnte im Verlauf der Arbeit mit Hilfe der NMR-Struktur von FBP11-WW1 in Gegenwart des Liganden bestätigt werden (Abschnitt III.2.5).

Es kann an dieser Stelle allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß auch andere Effekte einen ähnlichen Einfluß auf die Affinität zeigen könnten, wie z.B. Beeinträchtigung von Stabilität und Struktur der WW-Domäne infolge der Absenkung des pH-Wertes. Um diese Phänomene auszuschließen (bzw. zu untersuchen), müßten jedoch weitere Methoden, wie z.B. 1D- oder 2D-NMR einbezogen werden, mit denen sich diese Analysen auf die strukturelle Ebene ausweiten lassen, wie beispielsweise gezeigt für Histidin-Seitenketten in Serin-Proteasen und SH2-Domänen (Bachovchin, 1986; Singer & Forman-Kay, 1997).

#### III.1.5.4. Temperaturabhängigkeit und Bestimmung der thermodynamischen Parameter

Aus der Temperaturabhängigkeit von Dissoziationskonstanten lassen sich unter bestimmten Voraussetzungen wichtige thermodynamische Parameter der Bindung ableiten, die charakteristisch für die Wechselwirkungen sind, die der Bindung zugrunde liegen. So gestattet die Methode der van't Hoff-Analyse (Abschnitt II.12.4) die Trennung von enthalpischem ( $\Delta H$ ) und entropischem ( $\Delta S$ ) Anteil der Bindungsenergie ( $\Delta G$ ).

Dazu wurden Dissoziationskonstanten für die Bindung von PPN2 an WW-AKSM bei verschiedenen Temperaturen im Bereich von  $8^\circ\text{C}$  bis  $28^\circ\text{C}$  bestimmt. Innerhalb dieses Bereichs verringerte sich mit zunehmender Temperatur die Affinität (Erhöhung von  $K_D$ ) etwa um den Faktor 3 (Abbildung 31 A, Tabelle 22 im Anhang).



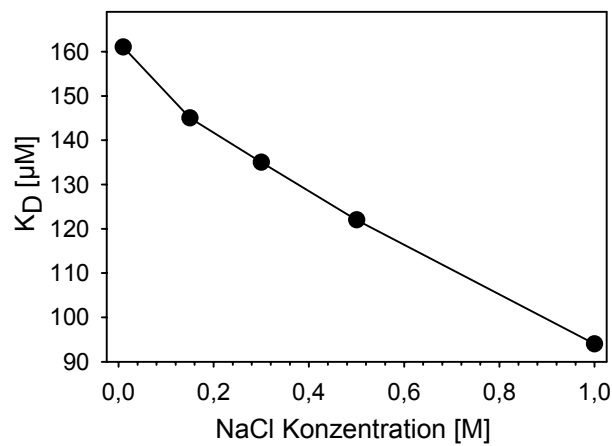
**Abbildung 31:** (A) Einfluß der Temperatur auf die beobachteten Dissoziationskonstanten für die Bindung von  $3.5 \mu\text{M}$  WW-AKSM an PPN2 in 'WW-Puffer HB' (B) Van't Hoff-Auftragung der Daten (siehe Tabelle 22 im Anhang) zur Ermittlung der thermodynamischen Parameter der Bindung (Bindungsenthalpie bzw. -entropie)

Anhand des nahezu linearen Verlaufs der Auftragung des logarithmierten  $K_D$  gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur (van't Hoff-Auftragung, Abbildung 31 B) wurde angenommen, daß sich die Wärmekapazität  $\Delta C_p$  des Systems im Temperaturbereich der Messungen nicht änderte. Die Daten wurden demzufolge durch lineare Regression angepasst, wobei sich aus dem Anstieg der Regressionsgeraden ( $\Delta H_{\text{obs}}/R$ ) eine Bindungsenthalpie  $\Delta H_{\text{obs}}$  von  $-37,8 \text{ kJ/mol}$  ergab. Aus der Bindungsenergie  $\Delta G$  von  $-22,1 \text{ kJ/mol}$  (ermittelt aus dem  $K_D$ -Wert für  $20^{\circ}\text{C}$ ) konnte der entropische Term der Bindungsenergie ( $T \cdot \Delta S_{\text{obs}}$ ) für diese Temperatur mit  $-15,7 \text{ kJ/mol}$  errechnet werden (siehe Abschnitt II.12.4). Daraus läßt sich schlußfolgern, daß der exotherme Bindungsprozeß vorwiegend aus dem Gewinn an Bindungsenthalpie angetrieben wird und den scheinbar entropisch ungünstigen Verlauf kompensieren kann. Eine ähnliche Verteilung der Beiträge zur Bindungsenergie ist für die Wechselwirkung der YAP65-WW-Domäne mit einem spezifischen Peptidliganden beschrieben (kalorimetrische Bestimmung von  $K_D=5,9 \mu\text{M}$ ,  $\Delta G=-29,3 \text{ kJ/mol}$ ,  $\Delta H=-58,6 \text{ kJ/mol}$ ,  $T \cdot \Delta S=-28,7 \text{ kJ/mol}$ , Koepf et al., 1999a). Die höhere Affinität dieser WW-Domäne bewirkt dabei offensichtlich keine wesentliche Verschiebung des Verhältnisses von Enthalpie und Entropie der Bindung.

Der oben geführte Vergleich der thermodynamischen Parameter der Ligandenbindung von FBP11-WW1 und YAP65-WW wird jedoch zum einen durch die verschiedenen Methoden der Bestimmung von  $\Delta H$  in seiner Aussage eingeschränkt. So sind teilweise signifikante Abweichungen zwischen kalorimetrisch bestimmten Enthalpien und van't-Hoff-Enthalpien beschrieben (Naghibi et al., 1995), die in vielen Fällen eine Verschiebung des Beitrags von Entropie und Enthalpie bewirkten, den thermodynamischen Charakter (Antrieb) der Wechselwirkung jedoch nicht revidierten. Zum anderen stellt die Annahme  $\Delta C_p=0$  eine Vereinfachung dar, die zwar aus dem (im Rahmen der experimentellen Ungenauigkeit) linear erscheinenden Verlauf der van't-Hoff-Auftragung näherungsweise abgeleitet werden kann, kalorimetrische Untersuchungen von Proteinen zeigten jedoch in zahlreichen Beispielen einen von Null verschiedenen  $\Delta C_p$ -Wert, der sich in einer Krümmung der van't-Hoff-Auftragung äußert. Das bedeutet gleichzeitig, daß in diesen Fällen die Bindungsenthalpie keine temperaturunabhängige Größe darstellt. Dem kann durch eine Anpassung der Daten an die integrierte van't-Hoff-Gleichung Rechnung getragen werden (Weber, 1995). Der dabei bewertete, nichtlineare Verlauf der Auftragung von  $\ln K_D$  gegen  $1/T$  konnte in der Auftragung der hier vorliegenden Daten jedoch nicht zweifelsfrei festgestellt werden. Insofern sollte die hier durchgeführte lineare Approximation zu ähnlichen Ergebnissen führen.

### III.1.5.5. Abhängigkeit von der Salzkonzentration

Aus der pH-Abhängigkeit der Dissoziationskonstante der Bindung von FBP11-WW1 an den Liganden PPN1 konnte zuvor auf den Beitrag ionisierbarer Gruppen (Imidazoleseitenkette von Histidin H20) geschlossen werden. Elektrostatische Wechselwirkungen der Bindung sollten dabei eine deutliche Abhängigkeit von der Ionenstärke des Puffers zeigen. Da prolinreiche Liganden von FBP11-WW1 keine geladenen Aminosäuren enthielten (lediglich Pro, Leu, Gly,  $\beta$ -Ala), wurde *a priori* keine unmittelbare Beeinflussung der Affinität durch die Ionenstärke des Lösungsmittels erwartet. Anhand der Bestimmung von Dissoziationskonstanten des Komplexes in Gegenwart verschiedener NaCl-Konzentrationen (0.01 bis 1 M, siehe Tabelle 22), wurde eine leichte Erhöhung der Affinität (Faktor 1.7) mit zunehmender Ionenstärke beobachtet (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Einfluß der im Puffer vorhandenen NaCl-Konzentration auf die Bindung von 3.5  $\mu$ M WW-AKSM an PPN2 bei 25°C (Pufferbasis: 'WW-Puffer TA'). Die Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 22 im Anhang aufgeführt.

Diese Beobachtung ist konsistent mit der Annahme, daß die Bindung nicht überwiegend durch ionische Wechselwirkungen bestimmt wird, bei der eine Abnahme der Affinität bei höheren Salzkonzentrationen erwartet worden wäre. Weiterhin stellt sie ein wichtiges Ergebnis für die Etablierung des kovalenten Kopplungssystems (Abschnitt III.3) dar, das durch hohe Ionenstärken in seiner Effizienz nicht eingeschränkt wird. Daß dieses Verhalten keine Allgemeingültigkeit für andere WW-Domänen hat, zeigten Bindungsstudien an den drei WW-Domänen der Ubiquitin-Protein-Ligase Nedd4 und den zugehörigen prolinreichen Liganden, die das PPxY-Motiv enthielten. Dabei wurden im allgemeinen Abnahmen der Bindungsaffinität (Faktor 1.5 bis 3) mit Erhöhung der Ionenstärke (im Bereich von 10 bis 150 mM KCl) beobachtet, die mit der höheren Abschirmung geladener, direkt an der Bindungsoberfläche befindlichen Aminosäuren von WW-Domäne und Ligand begründet werden kann (Kanelis et al., 2001). Die Salzabhängigkeit der Bindung von FBP11-WW1 zeigte sich weniger ausgeprägt, wobei das gegensätzliche Verhalten vermutlich auf den hydrophoben Charakter der zugrunde liegenden Wechselwirkungen hinwies. Die Beobachtung, daß durch Erhöhung der Salzkonzentration hydrophobe Wechselwirkungen verstärkt werden, läßt sich vermutlich mit der präferentiellen Hydratation des Proteins unter diesen Bedingungen erklären. Unter erhöhten Salzkonzentrationen kommt es bei der Ligandenbindung auch zu einer vermehrten Freisetzung von Wassermolekülen von der Oberfläche der WW-Domäne, was mit einem Entropiegewinn verbunden ist. In diesem Fall begünstigt dieser die Bindung und äußert sich in Form einer höheren Affinität (Timasheff & Arakawa, 1990).

### III.1.5.6. Bindungsstudien unter Verwendung Cellulose-Membran-gebundener Peptidbibliotheken (Spot-Technologie): Etablierung der Bindungsanalytik

Die Interaktion von FBP11-WW1 mit prolinreichen Liganden konnte in der vorliegenden Arbeit anhand einer Auswahl von geeigneten Peptiden in Lösung, d.h. WW-Domäne und Ligand waren in löslicher Form vorhanden, untersucht und charakterisiert werden (Abschnitte III.1.5.2 bis III.1.5.5). Die Etablierung des kovalenten Kopplungssystems auf der Basis dieser Interaktion (siehe Abschnitt III.3) erforderte es jedoch, eine Methode einzusetzen, die eine parallele Bindungsanalyse einer größeren Anzahl von Peptidliganden (Bibliothek) ermöglichte, um daraus optimale Kopplungspartner zu identifizieren. Der Weg der klassischen Peptidsynthese und nachfolgenden individuellen Reinigung der Peptide läßt sich dabei nur mit erheblichem materiellen und zeitlichen Aufwand bewerkstelligen. Für analytische Zwecke existieren jedoch alternative Verfahren, wie z.B. die Spot-Technologie, die eine Festphasen-gebundene Peptidsynthese und Bindungsstudie für eine Vielzahl von Liganden gleichzeitig erlaubt (Frank, 1992; Kramer & Schneider-Mergener, 1998). Dabei werden Peptide durch Aufbringen von so genannten *spots* (Punkte) auf einer derivatisierten Cellulose-Membran synthetisiert und die ggf. eingesetzten Schutzgruppen *in situ* abgespalten. Eine detaillierte Beschreibung der Syntheseabfolge ist Abschnitt II.11.2 zu entnehmen. Damit stehen an der Trägermembran immobilisierte Peptidbibliotheken zur Verfügung, die in einem parallelen Ansatz auf Bindungsaktivität hin überprüft werden können. Gebräuchliche Anwendungen dieser Technik sind Analysen von Protein-Protein-Interaktionsbereichen, wie z.B. die Identifizierung von Antikörper-bindenden Peptidsequenzen (*Epitop-Mapping*, Kramer et al., 1995; Reineke et al., 1996). Kontinuierliche Verbesserungen sowie die fortschreitende Automatisierung dieser Methode haben die Effizienz der Synthese sowie ihre Flexibilität in der Anwendung erhöht (Kramer et al., 1999; Toepert et al., 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden anhand dieser Methode mehr als 40 Varianten von prolinreichen, potentiellen Liganden von FBP11-WW1 sowohl manuell als auch halbautomatisch synthetisiert (Abschnitt II.11.2). Dabei wurden ausschließlich die Aminosäuren Pro, Leu, Gly und Cys (in Form der aktivierten Pentafluorphenylester) verwendet und schrittweise an eine mit  $\beta$ -Ala derivatisierten Cellulose-Membran gekoppelt. Durch Einsatz von hochkonzentrierten Lösungen (0.3 M) der vergleichsweise hydrolyseunempfindlichen Aminosäurederivate sowie zweifache Wiederholung jedes Kopplungsschrittes wurde versucht, möglichst vollständigen Umsatz bei jedem Schritt zu erreichen. Die Überprüfung erfolgte qualitativ durch Anfärbung freier Aminogruppen nach jeder Fmoc-Abspaltung bzw. Acetylierung mittels Bromphenolblau (nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, daß insbesondere die Spot-Randzonen bei der Applikation der Aminosäuren nicht vollständig erreicht wurden (Probleme: präzise Positionierung der Membran sowie Einstellung des Pipettier Volumens von 0.3  $\mu$ l). Es mußte davon ausgegangen werden, daß an diesen Stellen sowie an Bereichen von überlappenden Spots teilweise Fehl- bzw. Falschsequenzen synthetisiert wurden. Daher wurde bei der Bewertung der Bindungssignale im Wesentlichen der zentrale Bereich der Spots berücksichtigt. Die Abspaltung der S-Trityl-Schutzgruppe der Cysteine durch TFA ließ sich ebenfalls anhand der auftretenden intensiven Gelbfärbung der dabei freigesetzten Tritylgruppe verfolgen. An den Positionen cysteinfreier Peptide wurde diese Färbung erwartungsgemäß nicht beobachtet, bei den cysteinhaltigen Peptiden war sie von vergleichbarer Intensität (nicht gezeigt). Dieser Befund kann, zusammen mit der Farbindikation der freien Aminogruppen, als qualitative Bestätigung gesehen werden, daß die jeweiligen Peptide auf der Membran in vergleichbaren Ausbeuten erhalten wurden.

Um die Bindung der isolierten WW-Domäne an die membrangebundenen Peptidliganden sichtbar zu machen, war ein geeignetes Detektionsverfahren erforderlich. Prinzipiell boten sich dazu mehrere Möglichkeiten an, wie z.B. immunologische Methoden anhand von Antikörpern



(idealerweise gegen die isolierte WW-Domäne), radioaktive Markierung, Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffs oder Enzyms, dessen Aktivität nachfolgend detektiert werden kann (Frank, 2002). Mangels Verfügbarkeit eines Antikörpers gegen FBP11-WW1 und zwecks Vermeidung von Aviditätseffekten, wie sie für Bindungsanalysen von GST-WW-Fusionen beschrieben sind (Bedford et al., 1997; Kato et al., 2004), wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren etabliert, das auf einer chemischen Biotin-Markierung der isolierten WW-Domäne beruht. Da die FBP11-WW1 kein Cystein enthält, lag eine Biotinylierung über Aminogruppen nahe. Ein geeignetes Biotinderivat stellte NHS-Biotin dar (Abschnitt II.11.3), mit dem die Modifizierung von primären Aminogruppen möglich ist (Savage et al., 1992). Da FBP11-WW1 (WW-wt) über drei Lysine verfügt und die Ligandenbindung durch die Modifizierung so wenig wie möglich beeinflusst werden sollte, wurde eine möglichst spezifische Biotinylierung der Aminogruppe am N-Terminus der WW-Domäne angestrebt, der lösungsmittel exponiert sein sollte (Macias et al., 1996; Macias et al., 2000). Da der  $pK_a$ -Wert der Lysin-Seitenketten-Aminogruppe (10.3) höher als der  $pK_a$ -Wert der  $\alpha$ -Aminogruppe des N-Terminus ( $\sim 9$ ) ist, wurde die Reaktion bei möglichst niedrigem pH-Wert durchgeführt (pH 5.2, Abschnitt II.11.3), bei der die Reaktion aber noch ausreichend schnell verlief (Protonierung des N-Terminus verhindert Biotinylierung, Daten nicht gezeigt). Die einfach biotinylierte WW-Domäne wurde anschließend mittels RP-HPLC isoliert und lyophilisiert. Das erwartete Molekulargewicht konnte massenspektrometrisch bestätigt werden (Tabelle 21 im Anhang).

Die Detektion der Bindung der biotinylierten WW-Domäne an die membrangebundenen Peptidliganden konnte daraufhin anhand eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugates durchgeführt werden (Abbildung 14, Abschnitt II.11.4), das eine sehr hohe Affinität ( $K_D=10^{-15}$  M) und Spezifität gegenüber Biotin zeigt (Green, 1963; Bayer & Wilchek, 1980).

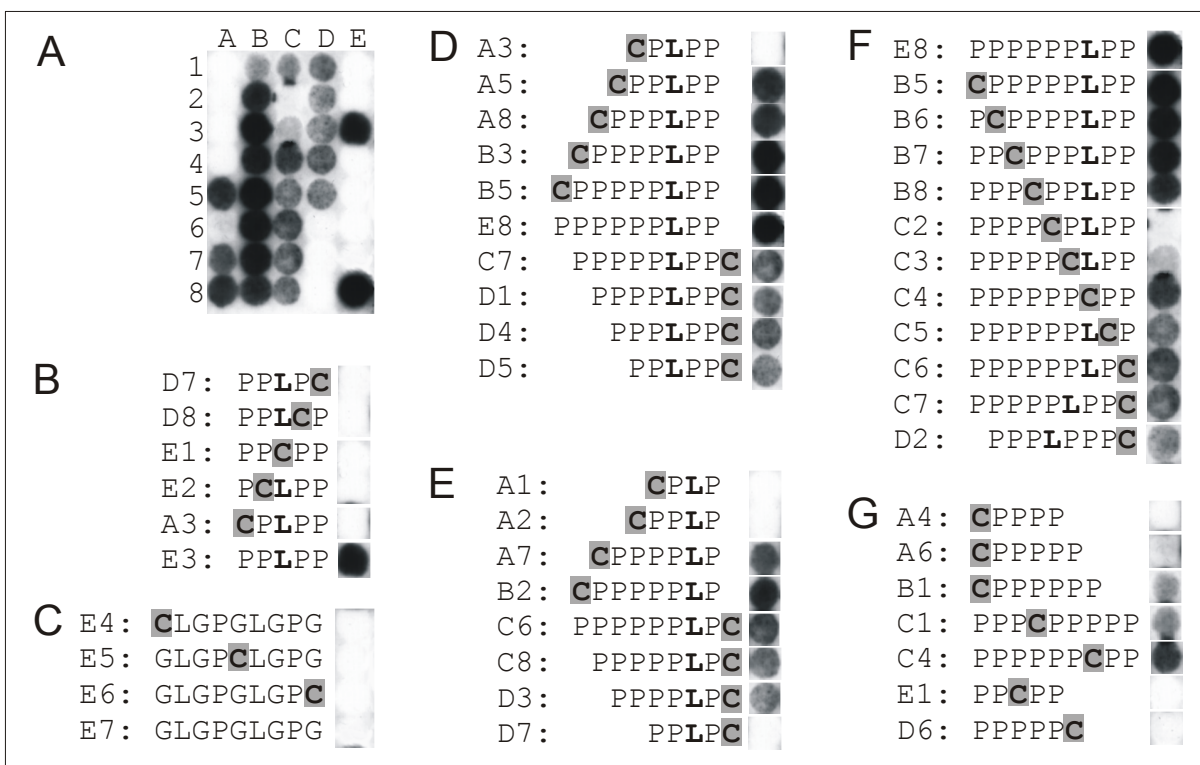
In Bindungsstudien an anderen WW-Domänen ist ebenfalls der Einsatz Cellulosemembran-gebundener Peptidliganden beschrieben, jedoch unterscheiden sich diese in Art und Weise der Detektion der Bindung von dem hier angewendeten Verfahren. Einen Großteil stellen Analysen von Liganden der WW-Domänen hYAP-WW, FE65-WW sowie Rsp5-WW dar, deren Bindung anhand von  $^{32}$ P-markierten GST-Fusionen der jeweiligen WW-Domäne untersucht wurden (Chen et al., 1997; Linn et al., 1997; Ermekova et al., 1997; Espanel & Sudol, 1999; Chang et al., 2000). Alternativ sind Arbeiten zu finden, in denen die (synthetisch hergestellte) WW-Domäne auf Spot-Membranen immobilisiert wurde und dementsprechend der prolinreiche Ligand mit einem geeigneten Enzym markiert wurde, das anschließend zur Detektion genutzt wurde (Toepert et al., 2001; Toepert et al., 2003; Otte et al., 2003). Eine verwandte Kategorie dazu bilden Bindungsstudien mit immobilisierten GST-WW-Fusionen (die allerdings keine Spot-Peptidsynthese mehr involvieren), deren Bindungseigenschaften (in gewisser Analogie zur vorliegenden Arbeit) anhand biotinylierter Peptidliganden verfolgt wurde. Letztere wurden jedoch vor der Bindung mit einem Streptavidin-Konjugat (POD- oder fluoreszenzmarkiert) modifiziert (Hu et al., 2004; Kato et al., 2004). Die genannten, reversen Ansätze erwiesen sich als geeignet, wenn eine parallele Analyse einer größeren Anzahl von WW-Domänen bzw. Varianten einer WW-Domäne von Interesse war.

Die Vielfalt der genannten Verfahren, die bei dieser Art der Bindungsanalytik bisher zum Einsatz kamen, verdeutlicht die Flexibilität der Spot-Technologie. Die Verwendung von biotinylierten WW-Domänen im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellte insofern ein Novum auf diesem Gebiet dar, da sie erstmals die Untersuchung der Bindung anhand einer isolierten, lediglich Biotin-modifizierten WW-Domäne ermöglichte, die nicht *a priori* von der Anwesenheit eines Fusionspartners oder konjugierten Enzyms beeinträchtigt wurde.

### III.1.5.7. Analyse der Bindung von FBP11-WW1 an Varianten prolinreicher Liganden

Das in Abschnitt III.1.5.6 etablierte Protokoll wurde eingesetzt, um die Bindung der biotinylierten FBP11-WW1-Domäne an geeignete prolinreiche Liganden zu analysieren, im speziellen Hinblick auf die Toleranz der Aminosäure Cystein im Ligand, die für die kovalente Assoziation von WW-Domäne und Ligand essentiell war (siehe Abschnitt III.3). Von diesem Hintergrund abgesehen ergaben sich jedoch aus diesen Untersuchungen eine Reihe weiterer, interessanter Aspekte, die als allgemeine Charakteristika der Bindung betrachtet wurden und daher an dieser Stelle näher beleuchtet werden sollen.

Mit Hilfe der Spot-Technologie wurde eine Serie von Cellulosemembran-gebundenen Peptidbibliotheken hergestellt, die Abkömmlinge des Liganden P<sub>6</sub>LPP darstellten, einem Fragment aus WBP-5 bzw. WBP-8A (*WW domain binding protein*), deren Bindung an FBP11-WW1 beschrieben ist. Aus einem Vergleich mehrerer Bindungspartner wurde dabei die Sequenz PPLP als Konsensusmotiv der Liganden identifiziert (Bedford et al., 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war im Wesentlichen von Interesse, wie sich die Länge des prolinreichen Liganden, die Anwesenheit des für FBP11-WW1 spezifischen Leucin-Restes, die Anzahl der dem Leucin folgenden Proline sowie die Anwesenheit eines Cysteins auf die Affinität auswirken. Neben den potentiell bindenden Peptiden, die eine Länge von maximal 9 Aminosäuren aufwiesen, wurde eine Reihe von Kontrollsequenzen synthetisiert, an denen die Spezifität der Bindung überprüft werden sollte. Das Raster der Membran, die Peptidsequenzen sowie die detektierten Bindungssignale sind aus Abbildung 33 ersichtlich.



**Abbildung 33:** Analyse der Bindung von FBP11-WW1 an 40 Varianten prolinreicher Peptide (einschließlich Kontrollpeptiden) einer Länge von maximal 9 Aminosäuren, die auf einer Cellulose-Papiermembran immobilisiert sind. **(A)** Bindung von 1  $\mu$ M biotinylierter WW-wt an die immobilisierten Peptide auf der Membran in 'WW-Puffer TB', Inkubation über 16 h bei 4°C, Belichtungszeit während der Detektion: 15 Sekunden. Die Bindungssignale der jeweiligen Peptide wurden aus dieser Abbildung extrahiert und in den Abbildungen B-G separat im Kontext ihrer Sequenz dargestellt. **(B)** Cystein-Mutationsanalyse des Bindungsmotivs PPLPP **(C)** Kontrollpeptide ohne prolinreiche Sequenz **(D)** Längenanalysen des Liganden (PPLPP-Motiv) mit N- bzw. C-terminalem Cystein **(E)** Längenanalyse des Liganden (PPLP-Motiv, ohne zweites Pro nach dem Leu) mit N- bzw. C-terminalem Cystein **(F)** Cystein-Mutationsanalyse des Liganden PPPPPLPP **(G)** Bindungsanalysen von Polyprolin-Liganden (ohne Leu im Bindungsmotiv).

Der Nachweis der an die Membran gebundenen, biotinylierten WW-Domäne lieferte für eine Vielzahl der prolinreichen Liganden ein deutliches Signal (Schwarzfärbung) in Form des jeweiligen Peptid-Spots. Dabei konnten unterschiedliche Intensitäten differenziert werden, die auf die variierende Affinität der Liganden hinwiesen. Die Aussagen dieser Bindungsexperimente sind trotzdem nur qualitativ zu betrachten, da sich aufgrund der hohen Sensitivität der Detektion keine reproduzierbaren Bedingungen finden ließen, unter denen die Signalintensität eine annähernd lineare Abhängigkeit von der Bindungsstärke aufwies (Daten nicht gezeigt).

Es überraschte nicht, das intensivste Bindungssignal am cysteinfreien Liganden P<sub>6</sub>LPP (Position E8) zu detektieren, von dem die übrigen Peptide abgeleitet worden waren. Die Spezifität von FBP11-WW1 für prolinreiche Sequenzen zeigte sich anhand der Kontrollpeptide (E4-E7, Abbildung 33 C), die keine Bindung zeigten. Aus den Längenanalysen in Gegenwart von N- oder C-terminalem Cystein (Abbildung 33 D und E) wurde das minimale Bindemotiv als PPLPP (E3) identifiziert. So konnte für die Peptide CPPLP (A2) und PPLPC (D7) noch keine Bindung detektiert werden, während für CPPLPP (A5) und PPLPPC (D5) eine deutliche bzw. moderate Bindung erkennbar war. Die Cystein-Mutationsanalyse des PPLPP-Motivs (Abbildung 33 B) und Leucin-Mutationsanalyse (Abbildung 33 G) ergaben, daß sich sowohl keiner der Reste von PPLPP durch Cystein ersetzen ließ (D7, D8, E1, E2, A3), als auch CPPPPP (A6) und PPPPPC (D6) keine Liganden mit signifikanten Bindungseigenschaften darstellten. Das Signal hoher Intensität an der Position von PPLPP (E3) unterstreicht zusätzlich den Befund, daß zumindest für kurze prolinreiche Peptide sowie in Gegenwart von flankierenden Cysteinen die Sequenz PPLPP das minimale Epitop der Bindung von FBP11-WW1 darstellt und das Leucin als essentiell angesehen werden kann. Unabhängige Bindungsstudien bestätigten dieses Ergebnis (Otte et al., 2003).

Die Bedeutung der Anzahl von Prolinen, die hinter Leucin im Ligand folgen, wurde außerdem aus einem Vergleich der Signale für CPPPPLPP (B3) und CPPPPLP (A7) ersichtlich, bei dem letzteres Peptid eine niedrigere Affinität zeigte. Je prolinreicher der Ligand wurde, um so weniger ausgeprägt zeigte sich dieser Unterschied (B5 und B2), da die Affinität offensichtlich auch von zusätzlichen Prolinresten vor dem Leucin erhöht wurde. Interessanterweise schien diese Beobachtung für die Varianten mit C-terminalem Cystein weniger Bedeutung zu haben, da die Bindungssignale von P<sub>5</sub>LPPC/P<sub>5</sub>LPC (C7/C8) bzw. P<sub>4</sub>LPPC/P<sub>4</sub>LPC (D1/D3) sich weniger drastisch unterschieden. Es wurde auch keine stärkere Bindung festgestellt, als ein dritter Prolinrest hinter dem Leucin eingefügt wurde (D2) - im Gegenteil, es wurde eher eine Verringerung der Affinität beobachtet, was bedeuten könnte, daß die Affinität dieser Liganden vorwiegend durch die Nähe des C-terminalen Cysteins limitiert wird.

Aus Bindungsstudien von FE65-WW mit prolinreichen Liganden war bekannt, daß eine Abfolge von sechs Prolinen hinreichend für eine *in vitro*-Bindung an diese WW-Domäne sind (Ermekova et al., 1997). Ein ähnliches Verhalten zeigte auch FBP11-WW1 anhand der hier analysierten Bindung (Abbildung 33 G). So war keine Bindung an die Peptide CP<sub>5</sub> (A6) bzw. P<sub>5</sub>C (D6) zu detektieren, während CP<sub>6</sub> (B1) schwache und P<sub>6</sub>CPP (C4) stärkere Wechselwirkungen zeigten (trotz Abwesenheit des Leu).

In Abbildung 33 F sind die Ergebnisse der Cystein-Mutationsanalyse (Cystein-Scan) des Liganden P<sub>6</sub>LPP dargestellt. Dabei fielen besonders die Peptide P<sub>4</sub>CPLPP und P<sub>5</sub>CLPP auf, die Cystein anstelle von Prolin an den beiden Positionen vor Leucin enthielten (C2, C3). Bei diesen Varianten konnten keine bzw. nur sehr schwache Bindungssignale festgestellt werden, was dafür spricht, daß Cystein an dieser Position das PPLP-Motiv zerstört und die Bindung unterdrückt. Analog dazu könnte man dieses Verhalten ebenfalls für die Liganden P<sub>6</sub>CPP, P<sub>6</sub>LCP sowie P<sub>6</sub>LPC (Positionen C4 bis C6) erwarten, diese zeigten jedoch deutliche Bindungssignale. Das bestätigt wiederum den Befund, daß reine Polyprolinsequenzen (ab P<sub>6</sub>) den Verlust des PPLP(P)-Motivs

kompensieren können und ebenfalls gebunden werden. Vergleicht man die Intensitäten der jeweiligen Spots, so scheint die Polyprolin-Affinität (B1) jedoch geringer zu sein als die der spezifischen Wechselwirkung mit dem PPLPP-Motiv (A8). Möglicherweise passen Polyprolinliganden schlechter in die PPLP(P)-Bindungstasche von FBP11-WW1 oder die Erkennung von Polyprolin erfolgt über eine zweite, unabhängige Bindungsstelle mit niedrigerer Affinität. Der Einfluß der Cysteinposition im Liganden auf die Affinität zur WW-Domäne wird in Abschnitt III.3.3 näher beschrieben.

Erst kürzlich wurde für FBP11-WW1 eine weitere Substitutionsanalyse beschrieben, bei dem jede Position des Liganden APPTPPPLPP (PPN4), sukzessiv durch alle proteinogenen Aminosäuren, mit Ausnahme von Cystein, ersetzt wurde (Otte et al., 2003). In der Studie wird ebenfalls die Sequenz PPLP(P) als essentielles Epitop identifiziert, da sich innerhalb dieses Motivs kein Rest durch eine beliebige andere Aminosäure austauschen läßt, ohne den Verlust der Bindung zur Folge zu haben. Lediglich die Substitution von Leucin durch Prolin führt zu der bereits erwähnten, schwächeren Bindung der dabei entstandenen Polyprolin-Variante APPTP<sub>6</sub>. Davon abgesehen unterbricht der Threonin-Rest in allen übrigen Varianten dieses Liganden die Prolin-Serie, die dadurch in keinem Fall die Länge von 6 aufeinander folgenden Prolinen erreicht. In der Konsequenz erschien in diesen Experimenten die Bindung von FBP11-WW1 an PPN4 allein von der Anwesenheit des PPLPP-Motivs abhängig. Beide Bindungsanalysen von FBP11-WW1 anhand der Spot-Technologie können als einander ergänzend angesehen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch erstmals der Einfluß von Cysteinen im Kontext von prolinreichen Sequenzen untersucht, die bei bisherigen Analysen dieser Art stets ausgeschlossen wurden und in der Natur bisher noch nicht beobachtet wurden.

## III.2. Strukturaufklärung von FBP11-WW1

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es aus verschiedenen Gründen von Interesse, die Struktur der bisher wenig charakterisierten WW-Domäne FBP11-WW1 aufzuklären. So läßt sich aus der Struktur der WW-Domäne in Gegenwart eines spezifischen Liganden auf die Wechselwirkungen schließen, die der Erkennung des PPLP-Motivs zugrunde liegen. Daraus können ggf. allgemeine Regeln für Bindung und Spezifität der WW-Domänen dieser Klasse abgeleitet werden, für die bisher keine Struktur im Komplex mit einem Liganden beschrieben ist. Ein zweiter, insbesondere für die vorliegende Arbeit, wesentlicher Aspekt der Strukturbestimmung waren Konsequenzen, die sich daraus für das Design der Cystein-Mutanten von FBP11-WW1 und der prolinreichen Liganden ergaben. Die Kenntnis struktureller Details der PPLP-Bindung sollte außerdem die Interpretation von Ergebnissen biochemischer Untersuchungen (z.B. Bindungsanalysen) wesentlich vereinfachen.

Wie bereits für mehrere WW-Domänen beschrieben (siehe Abschnitt I.2.1), wurde auch im Fall von FBP11-WW1 die Methode der NMR-Spektroskopie angewendet, die zur Strukturaufklärung von Proteinen geringer Größe oftmals geeignet ist. Ein Großteil der in diesem Abschnitt beschriebenen Ergebnisse ist in Kooperation am Institut für Molekulare Pharmakologie (Berlin) in der Arbeitsgruppe von Prof. Oschkinat entstanden, in der sämtliche NMR-Experimente und Strukturrechnungen durchgeführt wurden. Die Herstellung und Reinigung der dafür benötigten isotopenmarkierten Proben erfolgte am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität (Halle).

### III.2.1. Herstellung und Reinigung von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierter WW-Domäne

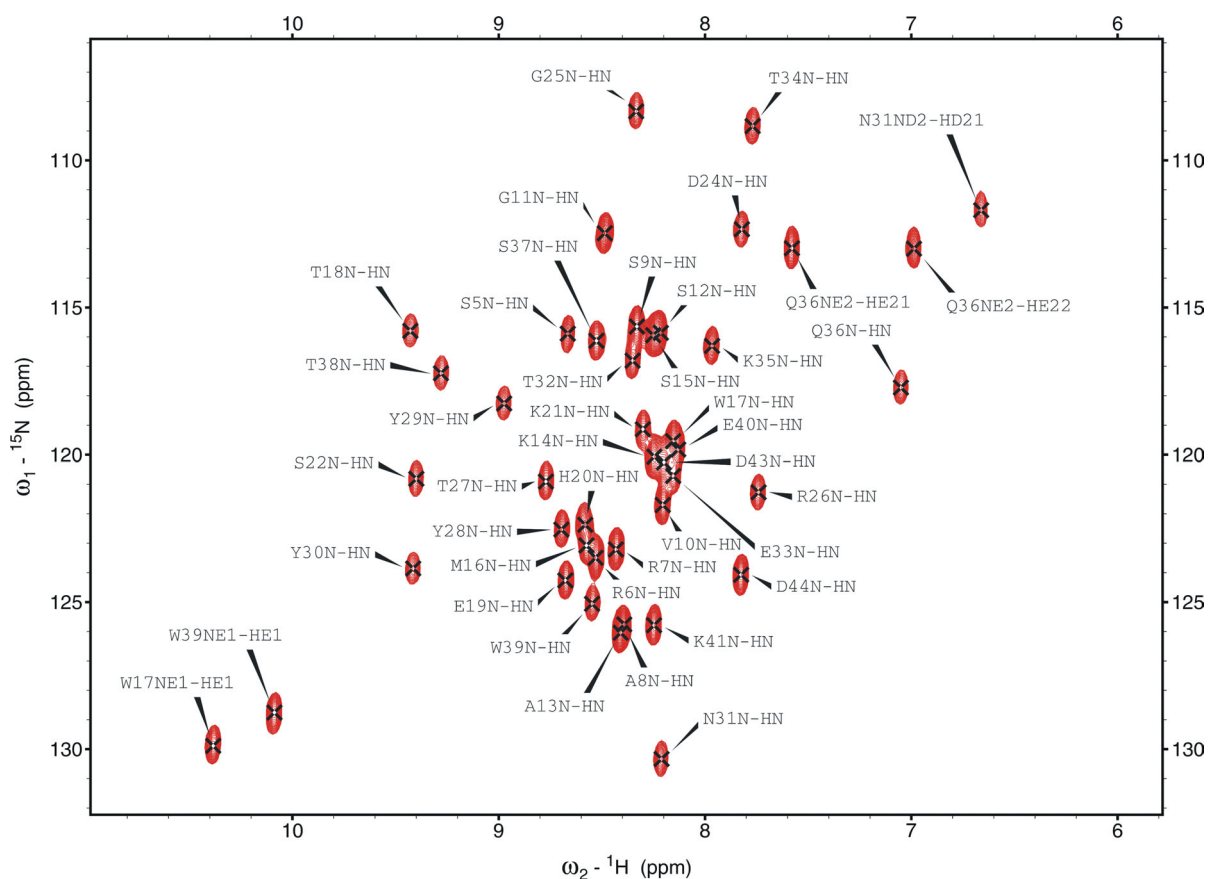
Obwohl die NMR-Strukturbestimmung von unmarkierten Proteinen bis zu einer Größe von etwa 50 Aminosäuren prinzipiell möglich ist (Aufnahme von  $^1\text{H}$ -homonuklearen NMR-Spektren), wird die Zuordnung der Resonanzfrequenzen innerhalb einer NMR-Analyse durch die Verwendung von isotopenmarkierten Proben erheblich vereinfacht. Dazu werden in der Regel  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$  einzeln oder in Kombination verwendet, die beide NMR-aktive Kerne darstellen im Gegensatz zu ihren natürlichen Isotopen  $^{14}\text{N}$  bzw.  $^{12}\text{C}$  (Wüthrich, 1986). Allerdings erfordert die Isotopen-Markierung von rekombinant hergestellten Proteinen die Kultivierung von Bakterien auf besonderen Minimalmedien, die C- und N-Quellen im isotopenmarkierten Zustand enthalten. Wie in Abschnitt II.10.2 beschrieben wurden in der vorliegenden Arbeit  $^{13}\text{C}$ -Glucose und  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid als ausschließliche C- bzw. N-Quelle verwendet, die dem Medium zugesetzt wurden. Die Herstellung der isotopenmarkierten Varianten der WW-Domäne ( $^{15}\text{N}$ -WW-AKSM und  $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -WW-AKSM) erfolgte analog zu den unmarkierten WW-Varianten in Form einer GST-Fusion (siehe Abschnitt III.1.2.1). Abgesehen von einer längeren *lag*-Phase bei der Zellanzucht, was allgemein bei Kultivierung in Mineralsalzmedien zu beobachten ist, war keine Anpassung der Wachstumsbedingungen erforderlich. Die Expressionsausbeute an isotopenmarkiertem GST-WW war vergleichbar mit der Anzucht in Vollmedium (siehe Abschnitt III.1.2.1). Ein direkter Vergleich unter identischen Bedingungen wurde jedoch nicht durchgeführt. Die Reinigung von GST-WW, nachfolgende proteolytische Abspaltung von GST sowie Gewinnung und Lyophilisation der isolierten WW-Domäne erfolgten wie beschrieben (Abschnitte III.1.2.1 und III.1.2.2). Die Molekularmasse der isotopenmarkierten WW-Domäne wurde massenspektrometrisch verifiziert (Tabelle 21 im Anhang). Daraus war ersichtlich, daß die Markierung quantitativ erfolgt war. Insgesamt wurden aus einer Anzucht im 3L-Maßstab 25 mg markierte WW-Domäne gewonnen.

### III.2.2. Aufnahme der NMR-Spektren und Zuordnung der Resonanzfrequenzen

Sowohl die Zuordnung der Resonanzfrequenzen zu den jeweiligen Atomen der WW-Domäne (*Assignment*) als auch die Ableitung der 3D-Struktur von freier und Liganden-gebundener WW-Domäne erfolgte durch Aufnahme einer Reihe mehrdimensionaler, teilweise heteronuklearer NMR-Spektren, wie in Abschnitt II.12.12 beschrieben.

Die chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Signale konnten dabei anhand von 3D-NMR-Experimenten (Kay, 1995; Sattler et al., 1999) mit Hilfe der doppelt markierten WW-Domäne (WW-AKSM) vollständig zugeordnet werden.

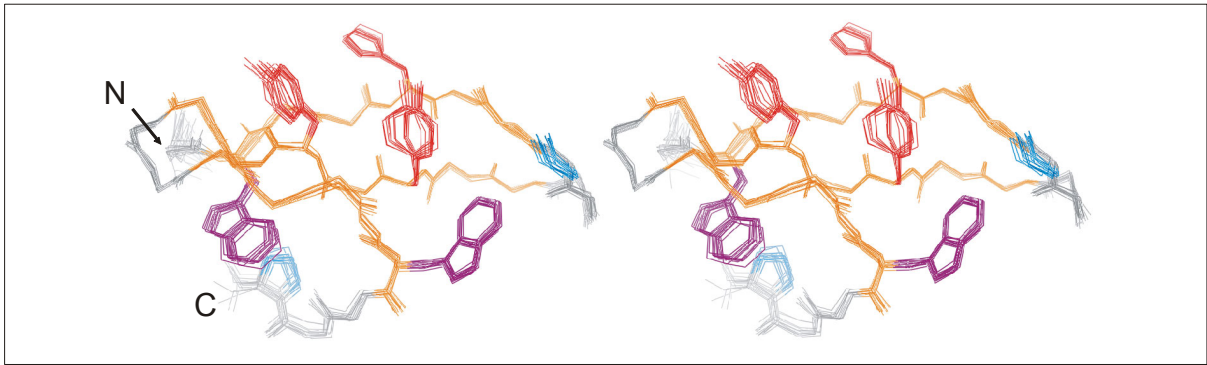
Das  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von FBP11-WW1 (Abbildung 34) zeigt beispielsweise die Zuordnung sämtlicher  $^{15}\text{N}$ -gebundenen Protonen, die sowohl die Amidprotonen (NH) des Peptidrückgrates als auch entsprechende Seitenkettenprotonen von Tryptophan, Glutamin und Asparagin umfassen. Dabei konnte jeder Aminosäure im Bereich von A14 bis D44 der Variante WW-AKSM ein NH-Signal zugeordnet werden, mit Ausnahme von Prolin, das über kein Amidproton verfügt. Die Existenz aller NH-Signale und die gute Signaldispersion des Spektrums bestätigt außerdem, daß FBP11-WW1 unter den vorliegenden Bedingungen (Proteinkonzentration: 1.8 mM, 25°C, 'WW-Puffer P-NMR', pH 6) in einem definierten, gefalteten Zustand vorliegt.



**Abbildung 34:**  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von FBP11-WW1. Jedes Signal entspricht einem  $^{15}\text{N}$ -gebundenen Proton, das dementsprechend gekennzeichnet ist: Amidprotonen des Peptidrückgrates (HN bzw. NH) oder Seitenkettenprotonen der Aminosäuren Trp, Gln und Asn (Nomenklatur der Protonen siehe Anhang VII.4)

### III.2.3. Struktur der isolierten WW-Domäne (ohne Ligand)

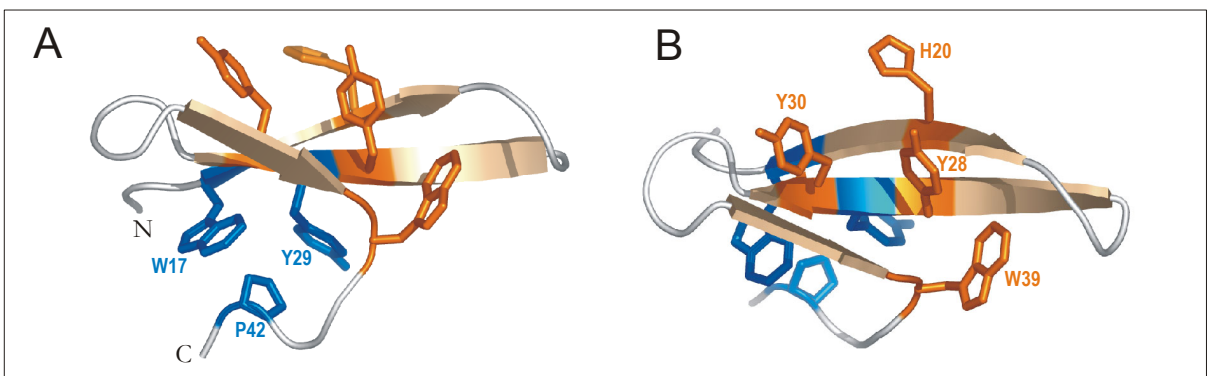
Die Struktur der freien WW-Domäne (WW-AKSM) wurde anhand von insgesamt 1041 experimentell bestimmten Limits (*restraints*), zumeist basierend auf NOE-Signalen, siehe Tabelle 23 im Anhang) errechnet. Dabei zeigten die Aminosäuren S15 bis P42 eine klar definierte räumliche Anordnung (Abbildung 35).



**Abbildung 35:** Stereodarstellung eines Struktur-Ensembles (15 energieärmste Lösungen der Strukturrechnung) der freien FBP11-WW1-Domäne in Abwesenheit des Liganden. Gezeigt sind das Peptidrückgrat im Bereich von S15 bis P42 ( $\beta$ -Faltblatt-Bereiche orange, Loops grau) sowie einige der konservierten Aminosäurereste (W17 und W39: violett, P23 und P42 blau, Y28/Y30 und H20: rot).

Die isolierte FBP11-WW1 zeigte die typische WW-Faltungstopologie: ein leicht verdrilltes dreisträngiges, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt. Der erste  $\beta$ -Strang (W17 bis S22) ist über Loop 1 (P23, D24, G25) mit dem zweiten  $\beta$ -Strang (R26 bis N31) verbunden. Loop 2 (I32 bis K35) geht schließlich in den dritten und kürzesten  $\beta$ -Strang (Q36 bis T38) über. Die innerhalb der WW-Domänen streng konservierten Reste W17, Y29 und P42 bilden dabei einen hydrophoben Cluster auf der Unterseite des  $\beta$ -Faltblattes (Abbildung 36 A, Macias et al., 1996), der wie eine Klammer wirkt und essentiell für die Ausbildung der Struktur ist (Koeopf et al., 1999a). Auf der Oberseite des  $\beta$ -Faltblattes befinden sich die aromatischen Reste W39, Y28 und Y30, die zusammen mit H20 die konkave Seite des Faltblattes ausfüllen und damit eine fast flache, hydrophobe Fläche bilden (Abbildung 36 B), die in die Ligandenbindung involviert ist (Macias et al., 1996).

Die räumliche Orientierung von Loop 1 (P23, D24, G25) wird durch mehrere NOE zwischen W39 und P23 bzw. D24 definiert, wobei diese Aminosäuren auffallend in Richtung  $\beta$ -Faltblatt-Oberseite ausgerichtet sind (Abbildung 35). Äquivalente NOE wurden beispielsweise für die Struktur der WW-Domäne von YAP65 (Klasse I) nicht gefunden (Pires et al., 2001). Die Aminosäuren der beiden Loops sind prinzipiell weniger konserviert innerhalb der verschiedenen WW-Domänen-Klassen, da sie wesentliche Determinanten der Ligandenspezifität darstellen (Zarrinpar & Lim, 2000).

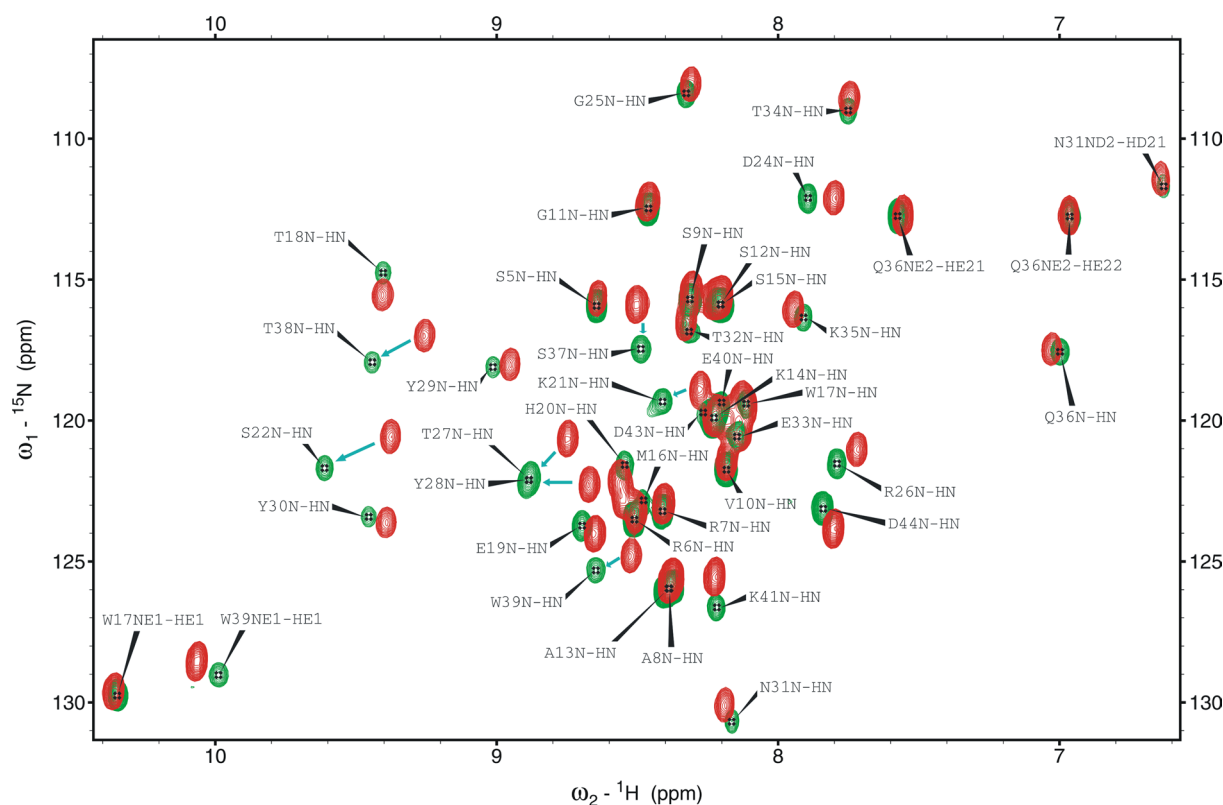


**Abbildung 36:** Vereinfachte Darstellung der NMR-Struktur der freien FBP11-WW1-Domäne mit dem 3-strängigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt als zentrales Strukturmotiv. **(A)** Darstellung der für die Stabilisierung der Faltungstopologie essentiellen Aminosäuren W17, Y29 und P42 (blau, Unterseite des Faltblattes) und **(B)** um  $45^\circ$  nach vorn gekippte Darstellung der konservierten Aminosäuren an der Oberseite des Faltblattes (orange: H20, Y28, Y30 und W39), denen eine Bedeutung bei der Ligandenbindung zugeschrieben wird.



### III.2.4. Analyse der Ligandenbindung mittels NMR

Die Zugabe des Liganden PPN4 in zweifach molarem Überschuß zu FBP11-WW1 äußerte sich in der Verschiebung zahlreicher Resonanzsignale in verschiedenen NMR-Spektren. Diese Beobachtung spiegelt die strukturellen Veränderungen in der Umgebung der NMR-aktiven Kerne ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) wieder, die mit der Bindung einhergehen. Einige Beispiele sind in der Überlagerung der  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren (Abbildung 37) von FBP11-WW1 in Ab- bzw. Anwesenheit des Liganden PPN4 gezeigt. Die dabei betrachteten  $^{15}\text{N}$ -gebundenen Protonen repräsentieren Amidprotonen des Peptidrückgrates (NH) sowie einzelne Seitenkettenprotonen der WW-Domäne (Abschnitt III.2.2). Die Verschiebung zahlreicher NH-Signale vollzog sich zumeist in Richtung  $^1\text{H}$ -Tiefelfeld, das indolische  $\text{N}_\epsilon$ -Protonensignal von W39 war dagegen leicht hochfeldverschoben (10.1 auf 10 ppm). Besonders auffällige Verschiebungen zeigten die NH-Signale einiger Aminosäuren im  $\beta$ -Faltblatt von FBP11-WW1 (K21, T27, Y28, Y30, S37, T38), des konservierten W39 (dessen Beteiligung an der Prolin-Erkennung als gesichert galt) sowie der Reste, die den Loop 1 der WW-Domäne ausbilden (S22, D24). Die Gesamtheit dieser Veränderungen spricht für eine moderate Strukturänderung der WW-Domäne im Verlauf der Bindung des prolinreichen Liganden, in die bestimmte Reste jedoch mehr involviert sind als andere. Es ließ sich an dieser Stelle bereits vermuten, daß insbesondere Loop 1 und Aminosäuren des 2. und 3.  $\beta$ -Stranges sowie W39 eine besondere Rolle bei der Bindung spielen.

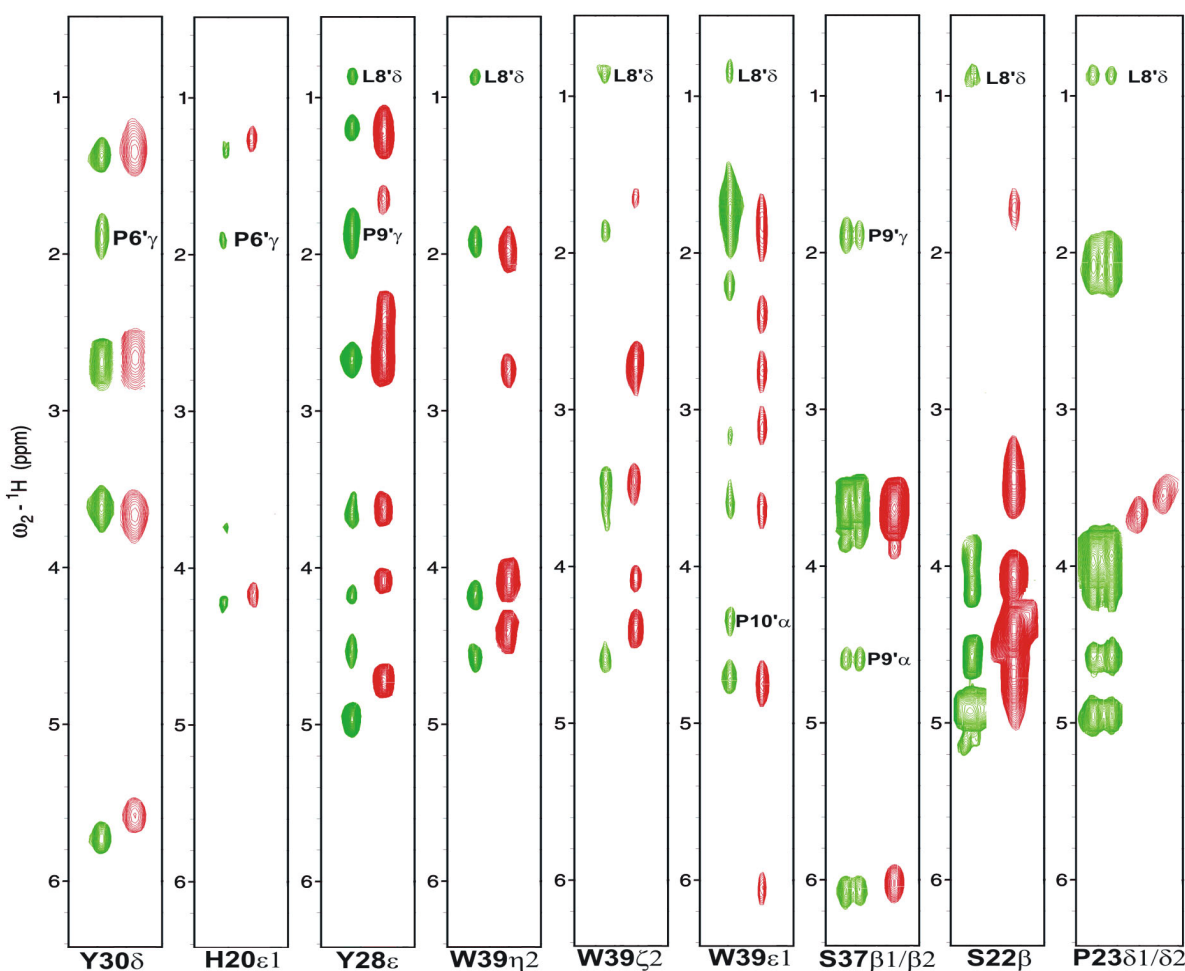


**Abbildung 37:** Überlagerung der  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren der freien WW-Domäne FBP11-WW1 (rot) und in Gegenwart des Liganden PPN4 (grün). Jedes Signal entspricht einem  $^{15}\text{N}$ -gebundenen Proton, das dementsprechend gekennzeichnet ist: Amidprotonen des Peptidrückgrates (HN bzw. NH) oder Seitenkettenprotonen der Aminosäuren Trp, Gln und Asn (Nomenklatur der Protonen siehe Anhang VII.4). Die blauen Pfeile verdeutlichen die Richtung einiger beobachteten Verschiebungen.

Eine genauere Aussage über die Wechselwirkungen zwischen bestimmten Aminosäuren von Ligand und WW-Domäne war nach der Aufnahme verschiedener heteronuklearer 3D-NMR-Spektren möglich, mit deren Hilfe die Zuordnung intermolekularer NOE-Signale zwischen



FBP11-WW1 und PPN4 erfolgte. In Abbildung 38 sind Ausschnitte aus 3D- $^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY- bzw. 3D- $^{15}\text{N}$ -HSQC-NOESY-Spektren dargestellt, die NOE-Signale bestimmter Seitenkettenprotonen der WW-Domäne zu Protonen des Liganden zeigen. So wurden beispielsweise mehrere NOEs zwischen dem Leucin-Rest (L8') von PPN4 und den Aminosäuren Y28, W39, S22 sowie P23 gefunden, die aus der räumlichen Nähe der jeweiligen Protonen (bzw. Aminosäuren) zueinander resultieren. Die eindeutige Zuordnung der aufeinanderfolgenden Proline des Liganden gestaltete sich dabei schwierig, da sie strukturell sehr ähnlich sind und infolgedessen zum Teil ununterscheidbare NMR-Signale ergeben (Abhilfe schaffen hier nur Messungen mit Abkömmlingen des Liganden, die selektiv an verschiedenen Prolin-Positionen eine Isotopenmarkierung tragen und damit unterscheidbar in der NMR werden). Trotzdem konnten NOE identifiziert werden, in die Prolinreste des Liganden involviert waren (P6' mit Y30 und H20, P9' mit Y28 und S37 sowie P10' mit W39).

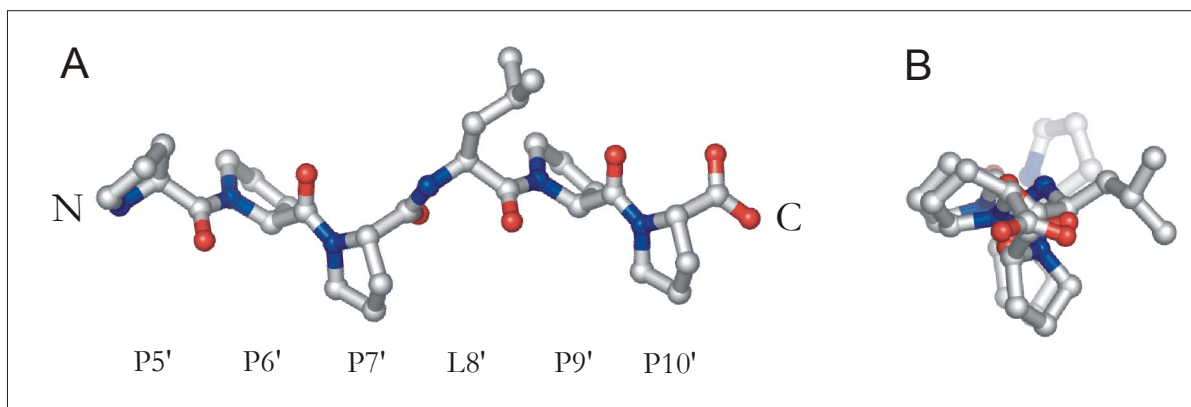


**Abbildung 38:** Vergleich von Ausschnitten aus 3D- $^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY-Spektren (bzw. 3D- $^{15}\text{N}$ -HSQC-NOESY-Spektren für W39 $\epsilon$ 1) von FBP11-WW1 im freien Zustand (rot) und in Gegenwart des Liganden PPN4 (grün). Jedes Signal entspricht einem NOE zwischen den unten angegebenen Protonen verschiedener Aminosäuren der WW-Domäne und einem Proton der WW-Domäne (intramolekularer NOE) oder des Liganden (intermolekularer NOE). Letztere sind mit den zugehörigen Resten des Liganden gekennzeichnet (Nomenklatur der Protonen siehe Anhang Abschnitt VII.4).

Die auffallenden, im Komplex hinzugekommenen NOEs für P23  $\delta$ 1/ $\delta$ 2 bei 2 ppm und 4-5 ppm (Abbildung 38, letzter Streifen), wurden als intramolekulare NOE von Aminosäuren in Loop 1 der WW-Domäne zugeordnet. Der interessante Befund, daß diese Signale nicht in der freien Domäne zu finden sind, könnte auf der Flexibilität dieses Loops beruhen (Abschnitt III.2.6).

### III.2.5. Struktur von FBP11-WW1 im Komplex mit einem prolinreichen Liganden

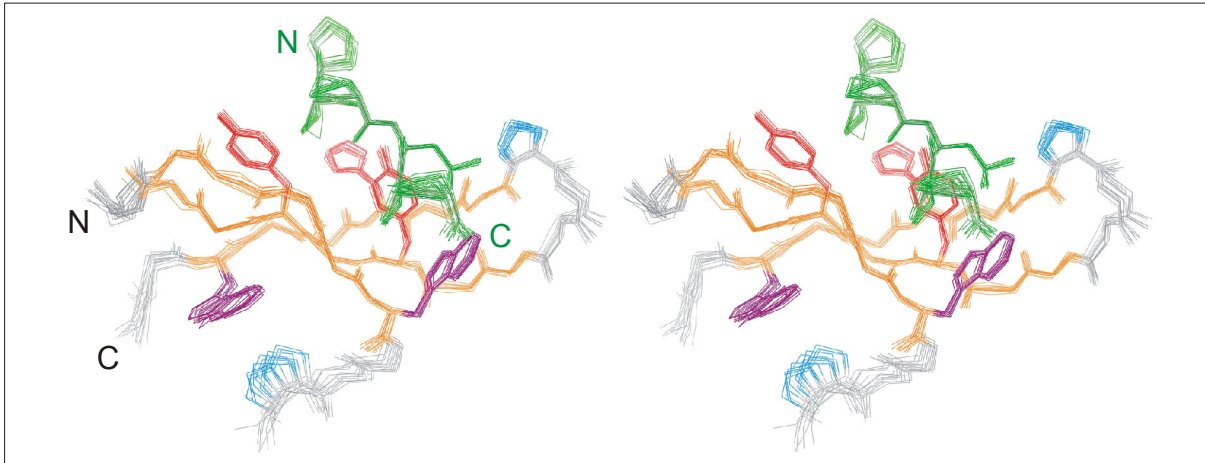
Die Bestimmung der Struktur der WW-Domäne im Komplex mit einem prolinreichen Liganden erfolgte in Gegenwart eines zweifachen molaren Überschusses von APPTPPPLPP (PPN4), der nicht in isopenmarkierter Form vorlag. Prolinreiche Sequenzen in Peptiden und Proteinen nehmen überwiegend die Polyprolin-II-Helix-Konformation ein, eine linksgängige Helix, die durch die Dihedralwinkel  $\phi$  und  $\psi$  von  $-78^\circ$  bzw.  $+146^\circ$  bestimmt wird (Cowan & McGavin, 1955). Konsequenz ist eine dreifache Rotationssymmetrie der Helix, wobei die Polyprolin-Sequenz auch andere Aminosäuren enthalten kann (Abbildung 39, Stapley & Creamer, 1999).



**Abbildung 39:** Strukturmodell des Peptids PPPLPP in Polyprolin-II-Helix-Konformation (wie im Komplex mit FBP11-WW1 vorliegend), **(A)** einer linksgängigen Helix mit einer Ganghöhe von 3 Aminosäuren (erkennbar an P6'/P9' sowie P7'/P10') **(B)** die dreifache Rotationssymmetrie (ausgenommen L8') wird in der  $90^\circ$  gedrehten Darstellung sichtbar. Die Proline sind dabei in *trans*-Konformation.

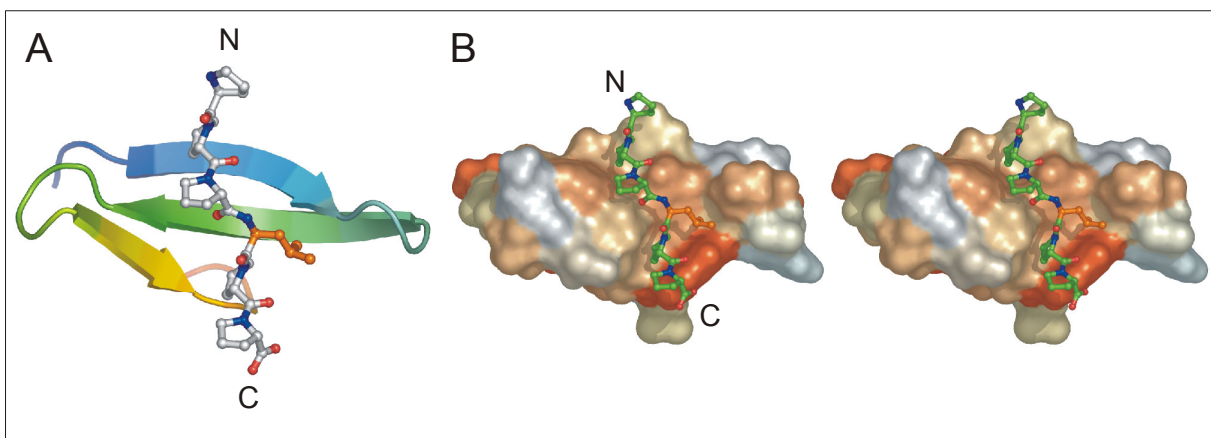
Die Strukturrechnungen des Komplexes erfolgten unter Annahme dieser Konformation für den Liganden PPN4, wie es auch in anderen Komplexen, die prolinreiche Sequenzen involvieren, beobachtet wurde (Adzhubei & Sternberg, 1993). Daß diese Annahme gerechtfertigt war, ergab sich aus Rechnungen, die ohne die konformationelle Restriktion von PPN4 durchgeführt wurden und zu sehr ähnlichen Ergebnissen führten (Daten nicht gezeigt).

Die Struktur der WW-Domäne im Komplex war durch insgesamt 823 experimentell bestimmte Limits (*restraints*) determiniert (Tabelle 23 im Anhang), wobei die Bindung von PPN4 an FBP11-WW1 sich in 40 intermolekularen NOE zeigte. Davon wurden 15 manuell sowie weitere 25 NOEs automatisch mittels ARIA (Nilges & O'Donoghue, 1998; Linge et al., 2001) zugeordnet. Von den manuell zugeordneten NOEs wurden 7 zwischen L8' des Liganden und Y28, W39, S22 bzw. P23 der WW-Domäne beobachtet (Abbildung 38 in Abschnitt III.2.4), woraus sich eine eindeutige Position und Orientierung des L8' in Bezug auf die WW-Domäne ergibt (Abbildung 40). In die übrigen 8 manuell zugeordneten NOEs waren Prolin-Reste involviert: zwischen P5' und H20, P6' und Y30, P9' und S37 bzw. Y28 und zwischen P10' und W39 (Abbildung 38). Anhand dieser und den 25 weiteren intermolekularen NOEs war die Ausrichtung des Liganden im gebundenen Zustand eindeutig bestimmt und entspricht einer NC- bzw. '+'-Orientierung (Zarrinpar & Lim, 2000). Letztere wurde auch für die Bindung von spezifischen Liganden der hPin1-WW-Domäne (Klasse IV, Verdecia et al., 2000; Bayer et al., 2003) beschrieben, während bisher bestimmte Strukturen der Komplexe von WW-Domänen der Klasse I (YAP65-WW, Dystrophin-WW, Nedd3-WW3) stets eine umgekehrte Orientierung (CN/-) des prolinreichen Liganden zeigten (Macias et al., 1996; Huang et al., 2000; Kanelis et al., 2001; Pires et al., 2001).



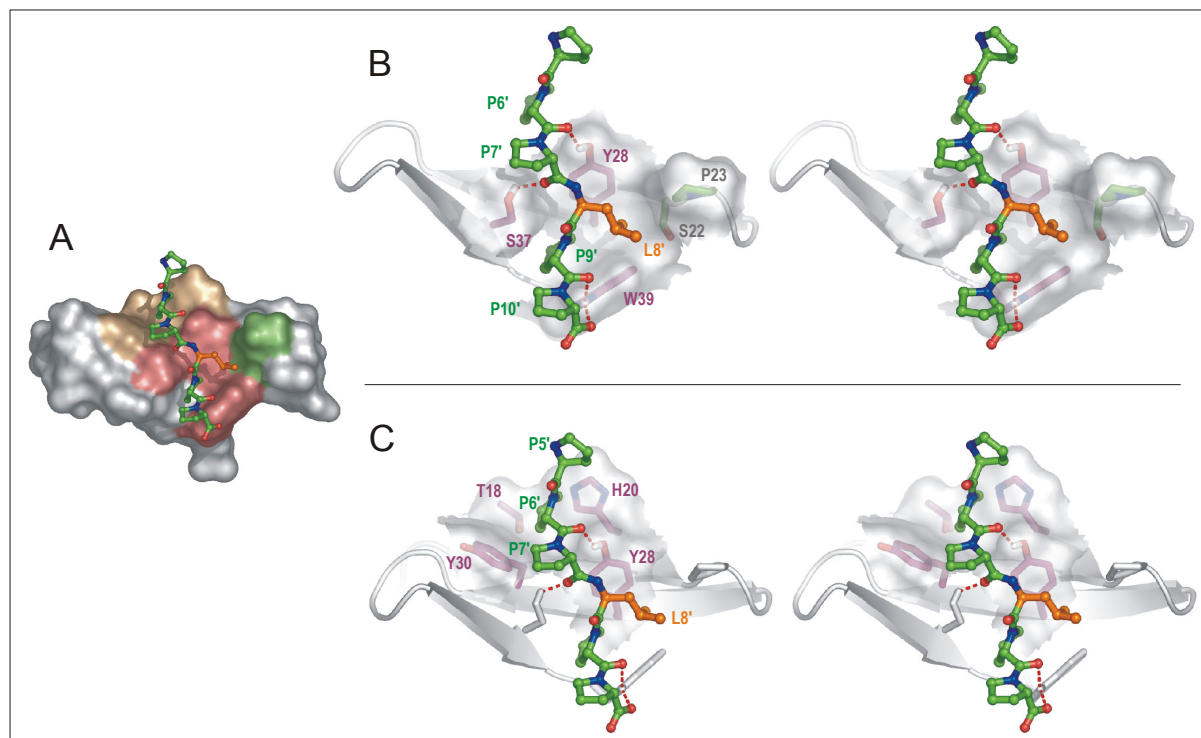
**Abbildung 40:** Stereodarstellung eines Struktur-Ensembles (15 beste Lösungen der Strukturrechnungen) der FBP11-WW1-Domäne im Komplex mit dem Liganden PPN4. Gezeigt sind das Peptidrückgrat der WW-Domäne im Bereich von S15 bis P42 ( $\beta$ -Faltblatt-Bereiche orange, Loops grau) sowie einige der konservierten Aminosäurereste (W17 und W39: violett, P23 und P42 blau, Y28/Y30 und H20: rot). Die Reste P5' bis P10' des gebundenen Liganden sind grün dargestellt.

Unterstützt durch die Ergebnisse aus den Analysen der Änderung chemischer Verschiebungen bestimmter Aminosäuren von FBP11-WW1 infolge der Ligandenbindung (Abschnitt III.2.4) ergab sich aus der Struktur des Komplexes die Topologie der Interaktion mit prolinreichen Sequenzen. Dabei wird der Ligand etwa senkrecht zum Verlauf der  $\beta$ -Stränge auf der konkaven Oberseite des Faltblattes gebunden, wodurch eine Reihe Kontakte zu vorwiegend hydrophoben Resten der WW-Domäne entstehen (Abbildung 41). Diese kommen im Wesentlichen durch aromatische Aminosäuren (W39, Y28, Y30) sowie weitere Reste im  $\beta$ -Faltblatt (T18, H20) zustande, aber auch Aminosäuren in Loop1 (S22, P23) sind in die Interaktion involviert. Seitens des Liganden APPTPPPLPP befanden sich lediglich die Reste P5' bis P10', die das Motiv PPLP enthalten, an der Bindungsoberfläche der WW-Domäne, während A1' bis T4' in der vorliegenden Struktur lösungsmittel exponiert vorlagen (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund bedeutet nicht zwangsläufig, daß diese Aminosäuren nicht an der Bindung beteiligt sind, vielmehr kann die Gegenwart von zusätzlichen Prolinresten einen Aviditätseffekt (Erhöhung der lokalen Prolin-Konzentration) auf die eigentliche Bindung haben und somit die Affinität der WW-Domäne zum Liganden erhöhen.



**Abbildung 41:** (A) Schematische Darstellung der Orientierung des Liganden PPN4 (P5' bis P10', L8' orange gefärbt) im Komplex mit FBP11-WW1 (Darstellung des  $\beta$ -Faltblattverlaufes vom N- zum C-Terminus (blau bzw. orange)). (B) Stereodarstellung der Moleküloberfläche von FBP11-WW1 mit gebundenem Liganden PPN4 (grün dargestellt, L8' orange eingefärbt). Kriterium für die Einfärbung der FBP11-WW1-Oberfläche war die Hydrophobizität der Aminosäuren (nach Eisenberg et al., 1984). Je intensiver die Orangegefärbung, desto hydrophober ist der entsprechende Aminosäurerest.

Bei genauerer Analyse ließen sich für die Erkennung von PPPLPP des Liganden PPN4 durch FBP11-WW1 zwei ähnliche und räumlich benachbarte, aber getrennt zu betrachtende Prolin-Bindestellen der WW-Domäne identifizieren (Abbildung 42 A). Die erste Bindestelle wird durch die Reste W39 und Y28 von FBP11-WW1 gebildet und ist konserviert in allen WW-Domänen. Die genannten Aminosäuren bilden dabei eine hydrophobe Tasche, in der Prolin stets so gebunden wird, daß der Prolinring parallel zur Indolgruppe des Tryptophans und senkrecht zur  $\beta$ -Faltblattebene ausgerichtet ist (Macias et al., 2002). Aus Abbildung 42 B wird ersichtlich, daß im vorliegenden Fall P9' nahe W39 positioniert ist, wobei die Carbonylgruppe von P9' (als auch P10') eine Wasserstoffbrücken-Bindung zum indolischen NH von W39 ausbilden kann. P10' selbst trägt hauptsächlich als Wasserstoffbrücken-Akzeptor zur Bindung bei, wobei nur Atome des Peptidrückgrates involviert sind, während der Prolinring in Richtung Lösungsmittel zeigt. Aus den intermolekularen NOEs war klar ersichtlich, daß L8' sich ebenfalls in dieser Bindestelle befindet. Die beiden Methylgruppen von L8' sind dabei in Kontakt mit Y28 sowie S22 und P23 in Loop 1 der WW-Domäne. Allerdings ist eine Methylgruppe deutlich lösungsmittel exponierter als die zweite, die in Richtung Bindungs Oberfläche orientiert ist. Diese Beobachtung erklärt auch die degenerierte chemische Verschiebung für beide Methylgruppen im ungebundenen Liganden ( $\delta=0.89$  ppm), die sich infolge der Bindung in zwei Signale auftrennte ( $\delta=0.86$  bzw.  $0.92$  ppm). L8' zeigt neben der hydrophoben Wechselwirkung zur aromatischen Seitenkette von Y28 kaum charakteristische Interaktionen, die die Spezifität von FBP11-WW1 für Leucin offensichtlich werden lassen. Vielmehr scheinen die Reste S22, P23, D24 und G25 in Loop 1 eine definierte Geometrie auszubilden, deren konformationeller Freiraum vermutlich durch die Anwesenheit von P23 weitestgehend eingeschränkt wird, so daß an dieser Position des Liganden z.B. kein Alanin, Valin oder Isoleucin anstelle von Leucin akzeptiert wird (Otte et al., 2003).



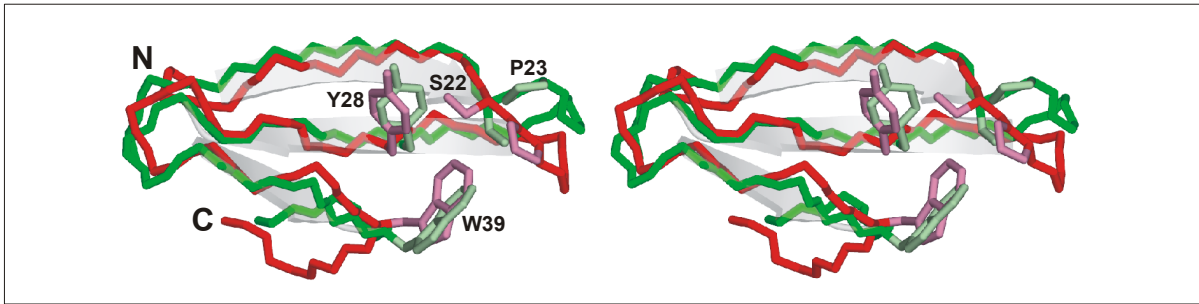
**Abbildung 42:** Darstellung der beiden Prolin-Bindestellen von FBP11-WW1: **(A)** Überblick mit Pro-Bindungsstelle 1 (rot gefärbt) und 2 (braun gefärbt). Die Reste S22/P23 in Loop 1 sind grün gekennzeichnet, ebenso Ligand (Stabdarstellung) mit L8' (orange). **(B)** Stereo-Abbildung der Pro-Bindungsstelle 1 und **(C)** von Pro-Bindungsstelle 2. Die involvierten Reste von WW-Domäne und Ligand sind jeweils gekennzeichnet. Wasserstoffbrücken sind durch rot gestrichelte Linien dargestellt.

Die Existenz einer zweiten Prolin-Bindungsstelle von FBP11-WW1 wurde bisher nur vermutet bzw. auf Basis von Modellierungsstudien an WW-Domänen hypothetisiert, da bis *dato* keine Strukturinformationen von WW-Ligand-Komplexen der Klassen II und III vorlagen (Macias et al., 2002; Kato et al., 2004). Aus der vorliegenden Struktur läßt sich eine solche Bindungsstelle, gebildet von den Aminosäuren Y28, Y30, H20 und T18 tatsächlich erkennen (Abbildung 42 C). Eine zentrale Rolle spielt dabei P6', dessen Ring aufgrund der Periodizität der Polyprolin-II-Helix eine P9' ähnelnde Orientierung, senkrecht zur Ebene des  $\beta$ -Faltblattes, aufweist. Die Reste Y28, Y30, H20 und T18 bilden dabei ebenfalls eine flache hydrophobe Tasche und befinden sich jeweils in etwa gleicher Entfernung zu P6'. Zwei Wasserstoffbrücken, bei denen die Proline P6' und P7' jeweils als Akzeptor beteiligt sind, stabilisieren die Bindung des Liganden. Eine H-Brücke wird zwischen der Carbonylgruppe von P6' und der Hydroxylgruppe von Y28 gebildet, eine weitere existiert zwischen der P7'-Carbonyl- und S37-Hydroxylgruppe. Letztere H-Brücke wurde ebenfalls in den strukturell aufgeklärten Komplexen von WW-Domänen beobachtet und stellt offensichtlich, unabhängig von der Orientierung des Liganden, ein konserviertes Merkmal der Ligandenbindung durch WW-Domänen dar. Diese Vermutung wird dadurch untermauert, daß an Position 37 sämtlicher WW-Domänen fast ausnahmslos die Aminosäuren Serin oder Threonin zu finden sind (Abbildung 4). Weiterhin ist der Pyrrolidinring von P7' durch seine  $\delta$ -Methylengruppe in räumlicher Nähe zum hydrophoben Y30 und weist eine Orientierung parallel zur Ebene des  $\beta$ -Faltblattes auf. Auch hier wird die experimentell beobachtete Spezifität (Abschnitt III.1.5.7, Otte et al., 2003) für Prolin an dieser Position des Liganden nicht sofort offensichtlich, jedoch zeigten vergleichende Bindungsstudien an WW- und SH3-Domänen, daß bei der Prolin-Erkennung nicht die Form der Prolin-Seitenkette für die Spezifität entscheidend ist, sondern die N-Substitution dieser Aminosäure, die bei keiner anderen natürlichen Aminosäure gegeben ist (Nguyen et al., 1998). Auf diese Weise wird in prolinreichen Liganden eine besondere Topologie des Peptidrückgrates erreicht, die für die hohe Spezifität bei vergleichsweise geringer Affinität verantwortlich ist.

### III.2.6. Struktureller Vergleich der WW-Domäne im freien Zustand mit dem Komplex

Abbildung 43 zeigt die Unterschiede der FBP11-WW1-Strukturen in Ab- bzw. Anwesenheit des prolinreichen Liganden PPN4. Beide Strukturen ließen sich mit einem durchschnittlichen RMSD-Wert von 1.95 Å bezogen auf das Peptidrückgrat der Reste S15 bis P42 überlagern. Wurden nur die Atome des Peptidrückgrates der Aminosäuren im  $\beta$ -Faltblatt berücksichtigt, so ergab sich ein mittlerer RMSD von 0.98 Å, während der Vergleich der in Loop 1 befindlichen Reste S22 bis G25 mit durchschnittlich 2.96 Å die größten strukturellen Abweichungen innerhalb der Strukturen zeigte. Die Aminosäuren N31 bis K35 des Loop 2 unterschieden sich dagegen nur um 1.17 Å (mittlerer RMSD des Peptidrückgrates). Daraus wird ersichtlich, daß die wesentlichen strukturellen Änderungen bei der Bindung des Liganden im Bereich von Loop 1 der WW-Domäne vonstatten gehen. Diese Vermutung hatte sich bereits aus der Überlagerung der <sup>15</sup>N-HSQC-Spektren (Abschnitt III.2.4) ergeben. Weiterhin wies darauf auch ein Vergleich von NOESY-Spektren der freien und gebundenen FBP11-WW1 hin, der das Verschwinden einer Reihe von intramolekularen NOE zwischen W39 und P23/D24 der WW-Domäne infolge der Zugabe des Liganden zeigte (Daten nicht gezeigt). In der Überlagerung der beiden NMR-Strukturen nehmen insbesondere die Reste in Loop 1 (z.B. S22 und P23 in Abbildung 43) in Anwesenheit des Liganden signifikant veränderte Positionen ein. Die Aminosäuren Y28 und W39 dagegen zeigen eine geringfügige Reorientierung der aromatischen Seitenketten.





**Abbildung 43:** Stereo-Abbildung der strukturellen Überlagerung der Peptidrückgrate von freier FBP11-WW1-Domäne (rot) und selbiger im Komplex mit dem Liganden PPN4 (grün, Ligand nicht gezeigt). Der Verlauf der drei  $\beta$ -Stränge ist schematisch dargestellt. Die Reste S22 und P23 innerhalb Loop 1 sowie Y28 und W39 sind wesentlich in die strukturellen Veränderungen der WW-Domäne infolge der Bindung involviert.

Das  $\beta$ -Faltblatt der WW-Domäne stellt offensichtlich eine vergleichsweise rigide Bindungsfläche dar, während eine deutliche Reorganisation in Form der Auswärtsbewegung von Loop 1 nötig zu sein scheint, um dem wenig flexiblen, prolinreichen Liganden möglichst optimalen Zugang zu den beiden Prolinbindungsstellen zu ermöglichen. Da von Loop 1 offensichtlich auch die Spezifität von FBP11-WW1 für Leucin-haltige Polyprolinliganden ausgeht, läßt sich an dieser Stelle spekulieren, ob lediglich ein Ligand, der Leucin in adäquater Position enthält, ein optimales Rearrangement von Loop 1 bewirken kann und so zu einer spezifischen Bindung beiträgt.

### III.3. Etablierung des kovalenten Kopplungssystems

#### III.3.1. Überblick

Einen wesentlichen Aspekt der vorliegenden Arbeit stellte die Etablierung eines Kopplungssystems auf Basis der Wechselwirkung von WW-Domänen mit prolinreichen Liganden dar, das eine kovalente Assoziation von Proteinen ermöglicht. Dabei sollte die Affinität einer WW-Domäne (hier: FBP11-WW1) zu einem geeigneten Liganden (in vorliegendem Fall mit PPLP-Motiv) genutzt werden, um eine gerichtete kovalente Kopplung, in Form einer Disulfidbrücke zwischen WW-Domäne und Ligand auszubilden. Die auf diese Weise stabilisierte Wechselwirkung bildete die Grundlage eines Verfahrens zur stabilen Assoziation von Proteinen, die *per se* keine Affinität zueinander zeigen. Deren Eigenschaften werden jedoch in Form des Kopplungsproduktes, dem Heterodimer beider Moleküle, miteinander kombinierbar. WW-Domäne und prolinreicher Ligand in genetischer Fusion mit den zu assoziierenden Proteinen können daher als transplantierte Heterodimerisierungsmotive bezeichnet werden (siehe Abschnitt I.1.2).

Im Anschluß an die in den Abschnitten III.1 und III.2 dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen von Struktur, Stabilität und Bindungsaktivität der WW-Domäne war es notwendig, geeignete Cystein-Varianten von FBP11-WW1 und dem PPLP-Liganden abzuleiten, die sich für eine Disulfidverbrückung eignen würden, ohne dabei ihre Bindungseigenschaften zu verlieren. Einen zentralen Aspekt bei der Generierung dieser Varianten stellte die Position des eingeführten Cysteins im Kontext der sonst cysteinfreien Wildtypen von FBP11-WW1 und prolinreichem Liganden dar. Die Auswahl dieser Positionen wurde mit Hilfe von rationalen und systematischen ("kombinatorischen") Ansätzen der Experimente getroffen, wobei die vorliegende Arbeit keinen Anspruch auf Vollständigkeit bezüglich der untersuchten Kombinationsmöglichkeiten (Abschnitt III.3.2) von Cystein-Varianten der WW-Domäne und des Liganden stellen kann.

Von wesentlichem Interesse waren außerdem die Analyse der Stabilität des gebildeten kovalenten Komplexes der beiden Bindungspartner unter Redoxbedingungen sowie die Übertragbarkeit des Systems von den isolierten Komponenten auf Fusionsproteine. Die kovalente Assoziation am Beispiel der Modellproteine GST und GFP sollte dabei Prinzip und Anwendungsmöglichkeiten des Kopplungsverfahrens demonstrieren.

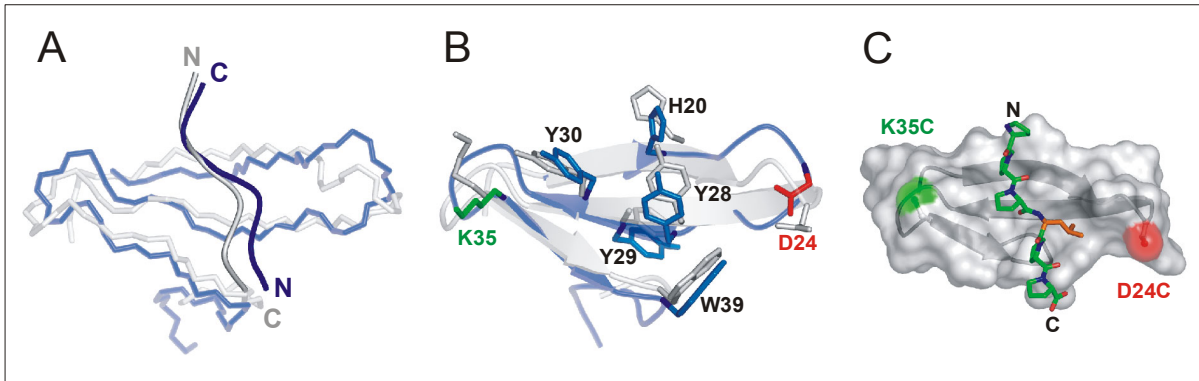
#### III.3.2. Cystein-Varianten der WW-Domäne

Zu Beginn der Arbeit existierten keinerlei experimentelle Strukturdaten von FBP11-WW1, allerdings war die generelle Faltungstopologie von WW-Domänen anhand von zwei aufgeklärten WW-Domänen-Strukturen bekannt. So war die NMR-Struktur der isolierten YAP65-WW-Domäne in Gegenwart eines prolinreichen Liganden sowie die Kristallstruktur der Pin1-WW-Domäne ohne Ligand (im Kontext der humanen Petidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase Pin1) beschrieben (Macias et al., 1996; Ranganathan et al., 1997).

Da die Cystein-Mutationen nicht an beliebigen Positionen innerhalb der FBP11-WW1-Sequenz eingeführt werden sollten und ein "kombinatorischer" Ansatz (Analyse sämtlicher der möglichen Cys-Varianten) vom Aufwand her nicht in Frage kam, war die Erstellung eines Strukturmodells der WW-Domäne FBP11-WW1 erforderlich. Anhand dieses Modells würden sich ggf. geeignete Positionen für Cystein-Mutationen ableiten lassen, die nicht mit der Struktur und Bindungsaktivität von FBP11-WW1 interferieren sollten (rationaler Ansatz).

### III.3.2.1. Modellierung und Mutagenese von WW-D24C und WW-K35C

Die Erstellung eines Strukturmodells der WW-Domäne (WW-wt) in Komplex mit einem prolinreichen Liganden (PPPLPP) erfolgte durch vergleichende Homologiemodellierung (Abschnitt II.12.11). Als strukturelle Vorlage dienten die Kristallstruktur der Pin1-WW-Domäne (Ranganathan et al., 1997) sowie die NMR-Struktur des Komplexes der YAP65-WW-Domäne mit einem prolinreichen Liganden (Macias et al., 1996).



**Abbildung 44:** Vergleich der homologiemodellierten Struktur (blau) und experimentell bestimmten Struktur (grau) von FBP11-WW1 **(A)** Überlagerung des Peptidrückgrates beider Strukturen in Gegenwart des Liganden. Die gegensätzliche Orientierung der Liganden verdeutlicht die zweifache Symmetrie der Polyprolin-II-Helix. **(B)** Überlagerung einiger Seitenketten beider Strukturen. Gezeigt sind einige zentrale Aminosäuren des  $\beta$ -Faltblattes (schwarz beschriftet) sowie die zur Mutagenese ausgewählten Reste D24 bzw. K35 in Loop 1 bzw. Loop 2 der WW-Domäne. **(C)** Oberflächendarstellung der mutierten WW-Domäne (modelliert) mit den exponierten Cystein-Resten an Position 24 bzw. 35 in Gegenwart eines PPPLPP-Liganden, wie er von wt-FBP11-WW1 gebunden wird. Die Cystein-Varianten von FBP11-WW1 (WW-D24C bzw. WW-K35C) tragen dabei stets nur eine Cystein-Mutation.

Anhand der Sequenzhomologie zwischen FBP11-WW1 und Pin1-WW (76% Homologie, 41% Identität) wurde eine Modellstruktur errechnet, die tatsächlich gut mit der im Verlauf der Arbeit experimentell bestimmten NMR-Struktur übereinstimmte (Abbildung 44 A und B). Beide Strukturen ließen sich anhand des Peptidrückgrates mit einem mittleren RMSD von 1.75 Å und unter Berücksichtigung sämtlicher Seitenketten mit 2.6 Å überlagern (jeweils Aminosäuren S15 bis P42). Diese Werte zeigten, daß die generelle Faltungstopologie der WW-Domänen von Pin1 und FBP11 sehr konserviert ist. Die Vorhersage der räumlichen Anordnung der Seitenketten dagegen war (erwartungsgemäß aufgrund der unterschiedlichen Bindungsspezifitäten von FBP11-WW1 und Pin1-WW) mit größeren Fehlern behaftet. Resultierend aus der Modellierung, entsprach die Orientierung des Liganden in der Modellstruktur genau der entgegengesetzten Ausrichtung, die experimentell für PPN4 im Komplex mit FBP11-WW1 bestimmt wurde (Abschnitt III.2.5). Die zweifache Pseudosymmetrie der Polyprolin-II-Helix-Konformation des Liganden äußert sich dabei für beide Orientierungen in sehr ähnlichen Geometrien an der Bindungsoberfläche der WW-Domäne (Zarrinpar & Lim, 2000).

Basierend auf der erhaltenen Modellstruktur der WW-Domäne wurden die Aminosäuren D24 und K35 als Kandidaten für die Cystein-Mutation ausgewählt. Daraus sollten die beiden Varianten WW-D24C und WW-K35C resultieren, die das Cystein jeweils exponiert in Loop 1 bzw. Loop 2 tragen (Abbildung 44 C). Kriterien für die Auswahl waren die relative geringe Konservierung dieser Aminosäuren innerhalb der verschiedenen WW-Domänen-Klassen (vgl. Abbildung 4), sowie die Überlegung, daß die betroffenen Aminosäuren Aspartat und Lysin aufgrund ihrer Ladung ggf. nicht an der Bindung des vergleichsweise hydrophoben Liganden beteiligt sind. Die Bindungseigenschaften der WW-Domäne wurden im Wesentlichen den hydrophoben Resten im zentralen Bereich des  $\beta$ -Faltblattes zugeschrieben, die von diesen



Mutationen nicht beeinflusst werden sollten. Die Einführung der Cysteine an den Positionen 24 bzw. 35 von WW-wt ist in Abschnitt II.9.5 beschrieben.

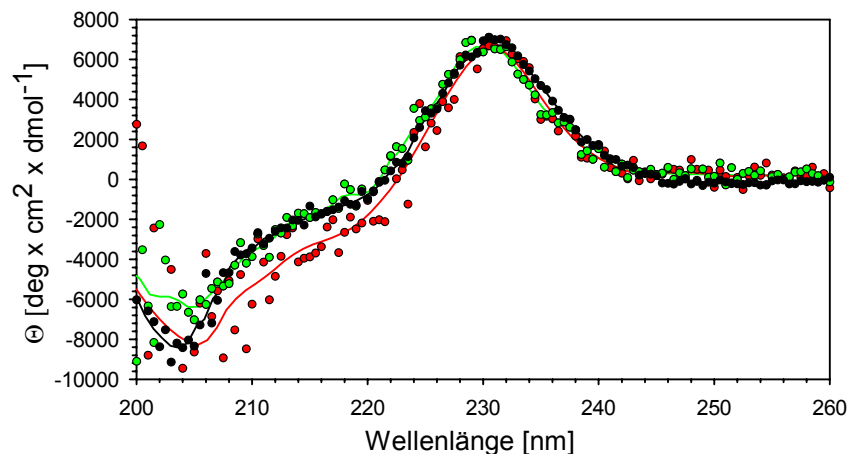
Wie aus Abbildung 44 C ebenfalls ersichtlich wird, befinden sich die Cysteine C24 bzw. C35 in relativ großer Entfernung vom Liganden ( $\sim 10 \text{ \AA}$ ). Das entspricht etwa dem doppelten Abstand der  $C_{\alpha}$ -Atome von zwei Cystinen in einer Disulfidbrücke. Diese Feststellung ergab sich erst im Verlauf der Arbeit aus der experimentellen Strukturaufklärung des FBP11-WW1-Komplexes (Abschnitt III.2.5). Die Festlegung auf die Cystein-Varianten WW-D24C und WW-K35C anhand des anfangs vorhandenen Strukturmodells ließ jedoch bereits erwarten, daß eine wesentliche Herausforderung der vorliegenden Arbeit darin bestehen würde, gleichzeitig sowohl die Bindung als auch die Disulfidverbrückung des prolinreichen Bindungspartners zu erreichen. Auf diese Problematik wird in Abschnitt IV.2.2 näher eingegangen.

### III.3.2.2. Charakterisierung der Cystein-Varianten

Die Expression und Reinigung der von WW-wt abgeleiteten Varianten WW-D24C und WW-K35C erfolgte in vollständiger Analogie zur Herstellung der cysteinfreien WW-Domäne. Erwartungsgemäß unterschieden sich dabei die Expressionsausbeuten nicht signifikant von denen der übrigen Varianten (Abschnitt III.1.2).

Um die korrekte Faltung und Bindungsaktivität zu untersuchen, wurden die Cystein-Varianten von FBP11-WW1 einer vergleichenden Charakterisierung unterzogen, wie bereits im Abschnitt III.1 für die Varianten des Wildtyps beschrieben. Die dabei erhaltenen Ergebnisse für WW-wt werden im Folgenden zu Vergleichszwecken ggf. noch einmal herangezogen.

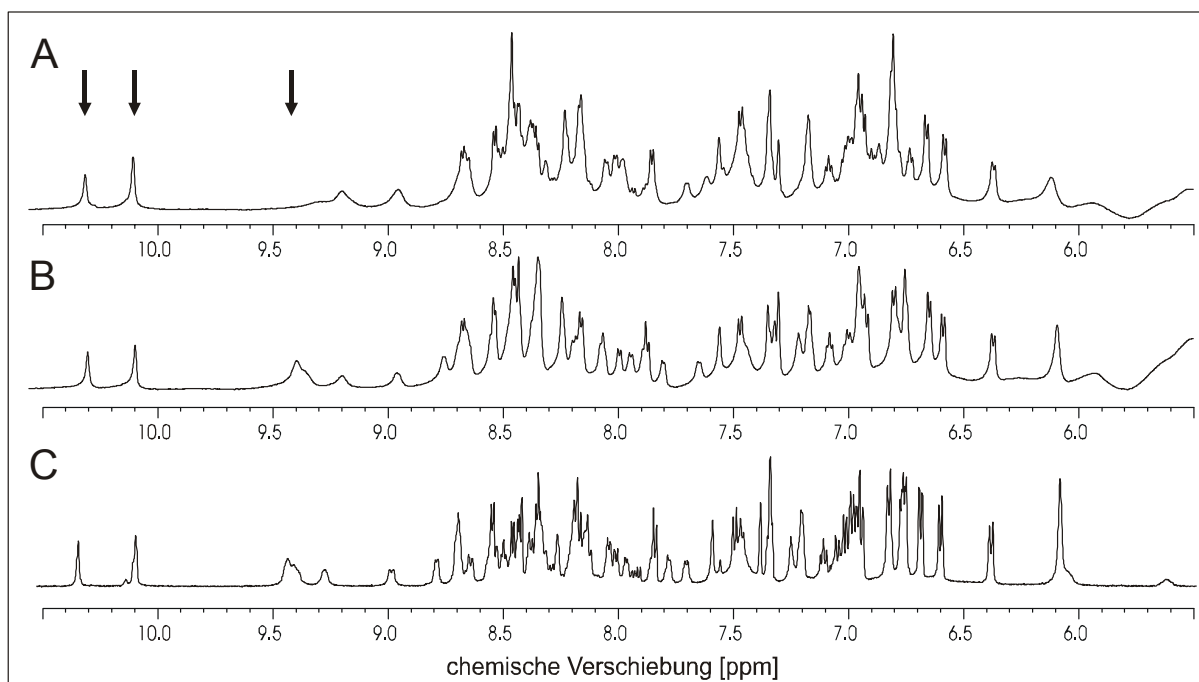
Die Analyse struktureller Eigenschaften erfolgte zunächst anhand des Circular dichroismus. Im Fern-UV-CD-Spektrum zeigten WW-D24C und WW-K35C, im Rahmen der Meßgenauigkeit, ein identisches Bild (Abbildung 45).



**Abbildung 45:** Fern-UV-CD-Spektren von 25  $\mu\text{M}$  WW-wt (schwarz), WW-D24C (rot) und WW-K35C (grün) in 'WW-Puffer P-FL' aufgenommen in einer 1mm-Küvette (3 Akkumulationen, Integrationszeit: 1 Sekunde)

Wie bereits für die cysteinfreien Varianten beschrieben, stellten das auch hier beobachtete Maximum bei 230 nm und der Bereich negativer Elliptizität charakteristische Merkmale gefalteter WW-Domänen dar (vgl. Abschnitt III.1.3.2). Das Fern-UV-CD-Signal bei 230 nm wurde im Fall des FBP11-WW1-Wildtyps genutzt, um die GdnHCl-induzierte Entfaltung zu verfolgen und daraus die freie Stabilisierungsenergie der WW-Domäne zu berechnen (Abschnitt III.1.4.1). Diese Analysen wurden für WW-D24C und WW-K35C jedoch nicht durchgeführt, Aussagen zu Stabilität der Varianten konnten daher an dieser Stelle nicht getroffen werden.

Im Vergleich der eindimensionalen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Varianten mit dem Wildtyp konnte die Vermutung bestätigt werden, daß WW-D24C und WW-K35C in gefaltetem Zustand vorlagen (Abbildung 46). So spricht nicht nur die chemische Verschiebung der beiden indolischen  $\text{N}_\epsilon\text{H}$ -Signale von W17 und W39, sondern auch die gute Signaldispersion von 6 bis 9.5 ppm, für das Vorhandensein der typischen WW-Domänen-Faltungstopologie (vgl. Abschnitte III.1.3.3 und III.1.4.2). Diesen Bereich des Spektrums bestimmen u.a. Amidprotonen des Peptidrückgrates (NH) von Proteinen mit charakteristischer Sekundärstruktur sowie Seitenkettenprotonen von aromatischen Aminosäuren in definierter Umgebung (Wüthrich, 1986; Koepf et al., 1999b).

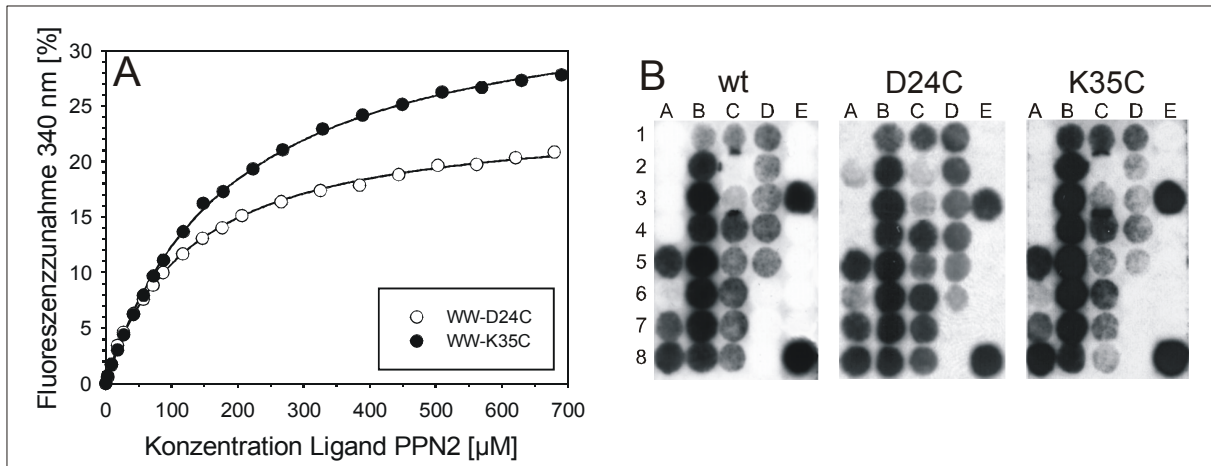


**Abbildung 46:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von 1 mM (A) WW-D24C (B) WW-K35C und (C) WW-wt aufgenommen in 'WW-Puffer P-NMR' in Gegenwart von 10%  $\text{D}_2\text{O}$  (v/v) bei 25°C. Gezeigt ist lediglich der Bereich oberhalb des Wassersignals ( $> 5.5$  ppm), das aufgrund unvollständiger Unterdrückung in den Spektren A und B noch sichtbar ist. Die charakteristischen  $\text{N}_\epsilon\text{H}$ -Signale von W17 (10.3 ppm) und W39 (10.1 ppm) sind jeweils durch Pfeile gekennzeichnet. Ein weiterer Pfeil markiert den Bereich der Signale um 9.4 ppm, die im Spektrum von WW-D24C fehlen.

Neben den genannten Gemeinsamkeiten der Spektren im Vergleich mit WW-wt, zeigten sich jedoch auch einige Unterschiede, die im Detail auf abweichende Strukturen der Varianten hinwiesen. So fehlen im Spektrum von WW-D24C beispielsweise einige Signale bei 9.4 ppm, die im Fall des Wildtyps auch die NH-Signale der Aminosäuren Y30, S22, T18 und T38 enthalten (vgl. Abbildung 34, Abschnitt III.2.2). Einige dieser Reste, so auch das eingeführte Cystein C24, befinden sich in der Nähe bzw. innerhalb von Loop 1 der WW-Domäne, dessen strukturelle Umgebung sich infolge der Mutation so verändert haben könnte, daß die  $^1\text{H}$ -Signale der genannten Aminosäuren nicht mehr an dieser Stelle des NMR-Spektrums zu finden sind. Abgesehen davon, ist die Aussagekraft von  $^1\text{H}$ -Spektren jedoch begrenzt, denn erst eine Zuordnung der Signale anhand von weiteren, heteronuklearen NMR-Experimenten erlaubt eine gesicherte Bewertung der beobachteten Veränderungen in Bezug auf einzelne Aminosäuren. Untersuchungen dieser Art an den Cystein-Varianten von FBP11-WW1 waren jedoch kein weiterer Gegenstand dieser Arbeit.

Der Erhalt der spezifischen Ligandenbindungseigenschaften der Varianten D24C und K35C war ein wichtiges Kriterium für die Etablierung des kovalenten Kopplungssystems. Die Analyse

erfolgte analog zu den Bindungsmessungen, die mit WW-wt durchgeführt worden waren (Abschnitt III.1.5.2). Zunächst wurden mittels Fluoreszenztitration Dissoziationskonstanten der Bindung beider Varianten an den (cysteinfreien) Liganden PPN2 bestimmt (Abbildung 47 A). Dabei wurde für WW-D24C ein etwas geringerer  $K_D$ -Wert ( $125 \pm 4 \mu\text{M}$ ) bestimmt als für WW-K35C ( $185 \pm 5 \mu\text{M}$ ). Beide Werte liegen jedoch in gleicher Größenordnung mit der für WW-wt bestimmten Affinität zu PPN2 ( $145 \pm 5 \mu\text{M}$ ).



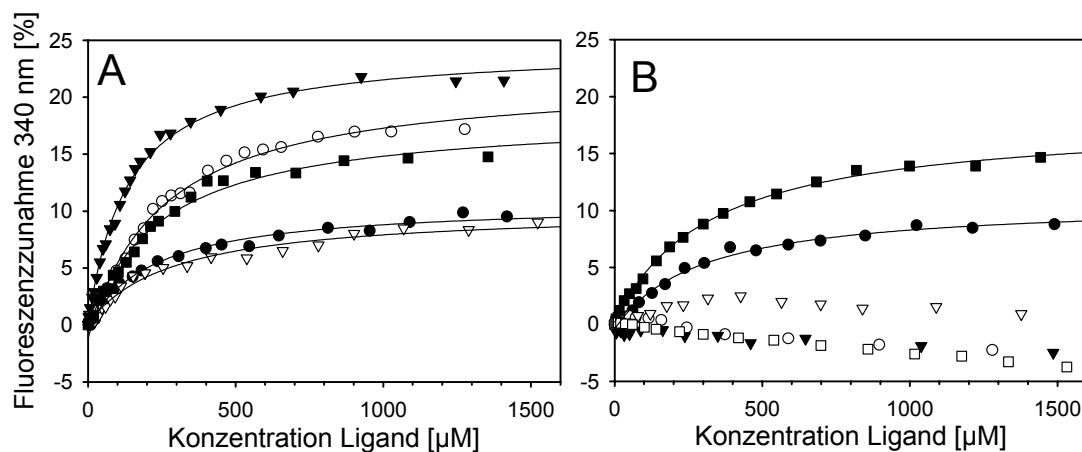
**Abbildung 47:** Analyse der Bindungseigenschaften von WW-D24C und WW-K35C zu prolinreichen Liganden. **(A)** Bestimmung der Dissoziationskonstanten von  $3.5 \mu\text{M}$  WW-D24C bzw. WW-K35C zum Ligand PPN2 in 'WW-Puffer TA' bei  $25^\circ\text{C}$  (Fluoreszenztitration). **(B)** Analyse der Bindung von  $1 \mu\text{M}$  biotinylierter WW-wt, WW-D24C bzw. WW-K35C an 40 Peptidvarianten, die auf einer Cellulose-Papiermembran immobilisiert waren (Inkubation: 16 h bei  $4^\circ\text{C}$  in 'WW-Puffer TB', Belichtungszeit während der Detektion: 15 Sekunden). Die Zuordnung der Spots zu den jeweiligen Peptidsequenzen ist aus Abbildung 33, Abschnitt III.1.5.7 ersichtlich.

Die Bindungsanalysen anhand von Cellulosemembran-gebundenen Peptidliganden (Spot-Technologie) erlaubten es, den Einfluß der Cystein-Mutationen in der WW-Domäne auf die Spezifität und die minimalen Ligandenerfordernisse der Bindung zu beurteilen (vgl. Abschnitt III.1.5.7). Im Rahmen der begrenzten Vergleichsmöglichkeiten dieser Methode, zeigte sich auch hier, daß die Varianten WW-wt, WW-D24C und WW-K35C ein sehr ähnliches Bindungsverhalten aufwiesen (Abbildung 47 B). Weder die Spezifität für das 'PPLP'-Motiv, das gleichzeitig die Mindestlänge des prolinreichen Liganden von 5 Aminosäuren repräsentiert, noch die Eigenschaft, auch reine Polyprolinsequenzen (ab  $P_0$ ) binden zu können, schien in den WW-Mutanten beeinflusst zu sein. Sämtliche Varianten zeigten eine scheinbar höhere Affinität zu Liganden mit N-terminalem Cystein als zu Kandidaten mit C-terminalem Cystein (siehe auch Abschnitt III.3.3). Einige Peptide, die im Fall von WW-wt die Bindungskriterien nicht erfüllten (z.B. Positionen A2, A6, C2, D6), wiesen in den Bindungsanalysen von WW-D24C und WW-K35C teilweise schwache Bindungssignale auf, die vermutlich auf eine intermolekulare Disulfidverbrückung der cysteinhaltigen WW-Domänen und Peptidliganden zurückzuführen war. Aufgrund der lokal hohen Cystein-Konzentrationen innerhalb der membrangebundenen Peptide konnte dieser Prozeß in den Bindungsstudien der cysteinhaltigen WW-Domänen nie ganz ausgeschlossen werden. Auch die Analyse der Bindung in Gegenwart eines Reduktionsmittel (bis zu  $100 \text{ mM}$  DTT), lieferte ein vergleichbares Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Auf diese Problematik wird in Abschnitt III.3.4.1 näher eingegangen.

### III.3.3. Cystein-Varianten des Polyprolin-Liganden

Aus den Bindungsstudien anhand der Cellulosemembran-gebundenen Peptidbibliothek von Varianten des FBP11-WW1-Liganden P<sub>6</sub>LPP (Nomenklatur der Aminosäuren: P1' bis P9') ließen sich bereits einige Schlußfolgerungen bezüglich der Toleranz von Cystein im Ligand ziehen (Abschnitte III.1.5.7 und III.3.2.2). So zeigten Peptidvarianten mit einem Cystein an Position von P1' bis P4' gute Bindungseigenschaften, an Position von L7' bis P9' nur noch moderate Bindung, während die Substitution der Reste P5' oder P6' durch Cystein zum Verlust des Bindungssignals führte (vgl. Abbildung 33 F). Letztere Beobachtung konnte mit der Zerstörung des für die Bindung notwendigen PPLP-Motivs bzw. der P<sub>6</sub>-Sequenz erklärt werden. Weniger eindeutig war die Interpretation der Beobachtung, daß Peptidvarianten mit C-terminalem Cystein ein schwächeres Bindungssignal zeigten, als die N-terminalen Cystein-Varianten, obwohl beide das vollständige PPLP-Motiv enthielten. Auf mögliche Ursachen wird in Abschnitt IV.1.2 näher eingegangen.

Aufgrund der schlechten Quantifizierbarkeit dieser Bindungssignale wurden weitere Bindungsmessungen mit einer Reihe von löslichen cysteinhaltigen, prolinreichen Peptiden mittels Fluoreszenztitration durchgeführt (Abbildung 48). Dabei handelte es sich um Peptide, die sowohl das für FBP11-WW1 spezifische Bindungsmotiv PPLP(P) enthielten, als auch jeweils ein Cystein an verschiedenen Positionen (vom N- bis zum C-Terminus) aufwiesen (Tabelle 13).



**Abbildung 48:** Analyse der Bindung von cysteinhaltigen, prolinreichen Liganden an 3.5 µM WW-wt. Die Analysen erfolgten bei 25°C in 'WW-Puffer TA' (+ 5 mM DTT) für die Liganden **(A)** PPC1, PPC2, PPC3, PPC4, PPC5 sowie **(B)** PPC6, PPC7, PPC8, PPC9, PPC10 und CTR-N (Zuordnung der grafischen Symbole siehe Tabelle 13). Die Bestimmung der  $K_D$ -Werte erfolgte anhand der Kurvenanpassungen an ein 1:1 Bindungsmodell.

Für die Mehrzahl der Cystein-Varianten konnten Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich bestimmt werden (Tabelle 13), vergleichbar mit  $K_D$ -Werten der cysteinfreien Liganden. Lediglich im Fall von PPC7, PPC8 und PPC9, sowie der Negativkontrolle CTR-N, einem Peptid ohne prolinreiche Sequenz, war die Fluoreszenzänderung infolge der Zugabe des Peptides nicht feststellbar bzw. nicht auswertbar. So zeigte PPC9 beispielsweise eine geringfügige, konzentrationsabhängige Zunahme des Signals, was durchaus als Bindung gewertet werden kann, jedoch war der Meßfehler zu hoch, um eine verlässliche Kurvenanpassung durchführen zu können (Abbildung 48 B).

**Tabelle 13:** Dissoziationskonstanten der Bindung von WW-wt an cysteinhaltige Polyprolin-Liganden

Ligand	Aminosäure-Sequenz	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ] <sup>1</sup>	Abb. 48	Symbol <sup>3</sup>
PPC1	S GCG SGS GSP PPP PPL P	$219 \pm 24$	A	●
PPC2	CSG PPP PPP PPL P	$245 \pm 19$		○
PPC3	CSG PPP PPP PPL PP	$132 \pm 6$		▼
PPC4	GCP PPP PPL P	$286 \pm 41$		▽
PPC5	SGC PPP PPL PP	$243 \pm 23$		■
PPC6	GPP CPP PPL P	$287 \pm 32$	B	●
PPC7	GGP PPC PPL P	- <sup>2</sup>		○
PPC8	GGP PPP PCL P	- <sup>2</sup>		▼
PPC9	GGP PPP PPL C	- <sup>2</sup>		▽
PPC10	GPP PPL PPG C	$319 \pm 17$		■
CTR-N	CGL GPG LGP G	- <sup>2</sup>		□

<sup>1</sup> Dissoziationskonstanten mit Standardfehlerangabe ermittelt aus den angepaßten Bindungskurven

<sup>2</sup> Fluoreszenzzunahme nicht vorhanden oder nicht auswertbar

<sup>3</sup> lt. Abbildung 48 A bzw. B

Diese Messungen bestätigten Schlußfolgerungen aus den vorangegangenen Bindungsanalysen dieser Arbeit. Die zentralen Reste des PPLP(P)-Motivs lassen praktisch keine Cystein-Mutation zu, ohne die Bindung völlig aufzuheben, bzw. auf eine Größenordnung herabzusetzen, die sich mit dieser Methode nicht mehr nachweisen läßt (PPC7, PPC8, PPC9). Eine Sonderrolle spielt dabei vielleicht PPC9, der zwar kein PPLP(P)-Motiv trägt, aber eine Abfolge von 6 Prolinen aufweist, die ebenfalls eine Bindung zeigen sollten (vgl. Abschnitt III.1.5.7). Die Affinität der WW-Domäne zu  $P_6$  ist dabei entweder zu gering, um hier quantifiziert werden zu können (d.h. hoch mikromolarer bis millimolarer  $K_D$ -Wert) oder die Bindung dieses Liganden erfolgt in zu großer Entfernung von den Tryptophanen, um eine signifikante Änderung ihrer Fluoreszenzintensitäten auszulösen. So ist denkbar, daß entweder die Abwesenheit des PPLP(P)-Motivs oder die Anwesenheit des Cysteins dazu führt, daß dieser Ligand nicht mehr an der konservierten Prolinbindungsstelle 1 (W39) binden kann, sondern ihm lediglich die zweite Bindungsstelle von FBP11-WW1 zur Verfügung steht (Abschnitt III.2.5). PPC10, der die PPLPP-Sequenz wiederum enthält, induziert trotz C-terminalem Cystein eine deutliche Intensitätszunahme der Fluoreszenz infolge der Bindung - ein Hinweis auf die größere Bedeutung des PPLP-Motivs für die Wechselwirkung. Die Liganden PPC4, PPC5 und PPC6 bestätigen, daß Cystein an Positionen N-terminal eines intakten PPLP(P)-Motivs toleriert wird und die Bindung nur geringfügig beeinflußt wird. Anhand der Dissoziationskonstanten von PPC1, PPC2 und PPC3 wird deutlich, daß Cysteine in ausreichendem Abstand von der prolinreichen Sequenz die Affinität des Liganden quasi nicht beeinträchtigen.

Ein Vergleich der quantitativen Bindungsdaten mit den Ergebnissen der Bindungsstudien, die mit Hilfe der Cellulosemembran-gebundenen Peptidbibliothek (Spot-Technologie) erhalten wurden (Abschnitt III.1.5.7), ist aus Tabelle 14 ersichtlich. Dabei war nicht in allen Fällen eine gute Korrelation der Bindungsdaten zu erkennen.

**Tabelle 14:** Vergleich von Ergebnisse der Bindungsmessungen, die mit löslichen Liganden bzw. Cellulosemembran-gebundenen Peptiden erzielt wurden. Äquivalenzkriterien der verglichenen Peptide waren Cysteinposition und -abstand vom Leucin-Rest.

lösliches Peptid	Ligand	$K_D$ [ $\mu$ M] <sup>1</sup>	äqu. Spot-Peptid(e) <sup>2</sup>	Pos. <sup>3</sup>	Spot-Signal
A GPP PPP PPL PP	PPN2	145	P PPP PPL PP	E8	
GC PPP PPL PP	PPC5	243 ± 23	C PPP PPL PP	B5	
GPP CPP PPL P	PPC6	287 ± 32	P CPP PPL PP	B6	
GGP PPC PPL P	PPC7	- <sup>2</sup>	P PPC PPL PP	B8	
GGP PPP PCL P	PPC8	- <sup>2</sup>	P PPP PCL PP	C3	
GGP PPP PPL C	PPC9	- <sup>2</sup>	P PPP PPL CP	C5	
GPP PPL PPG C	PPC10	319 ± 17	P PPP PLP PC	C7	
			P PPP LPP PC	D2	
CGL GPG LGP G	CTR-N	- <sup>2</sup>	C LGP GLG PG	E4	

<sup>1</sup> Bindung zu WW-wt, bestimmt durch Fluoreszenztitration

<sup>2</sup> immobilisiert auf Cellulosemembran (siehe Abschnitt III.1.5.7)

<sup>3</sup> lt. Abbildung 33

Das cysteinfreie Peptid PPN2 sowie die zwei Cysteinvarianten PPC5 und PPC6 ließen sich übereinstimmend als deutlich bindende Liganden einstufen. Ebenso ergaben beide Methoden keine Bindung der WW-Domäne an die Peptide PPC8 und CTR-N. Schwieriger gestaltete sich dagegen die Einschätzung von PPC7, der in der Fluoreszenztitration keine Bindung aufwies, wohl aber in Form des immobilisierten Spot-Peptids. Wie bereits an anderer Stelle diskutiert, liegt die Ursache vermutlich in der Gegenwart eines zusätzlichen C-terminalen Prolins im Liganden auf der Spot-Membran. Die daraus resultierende PPLPP-Sequenz ist für die Bindung der WW-Domäne hinreichend (Abschnitt III.1.5.7). Am Beispiel von PPC9 zeigte sich die schwächere Wechselwirkung der WW-Domäne mit reinen Polyprolinsequenzen ( $P_6$ ). Die Bindung war mit beiden Methoden detektierbar, ließ sich allerdings mittels Fluoreszenztitration, aufgrund einer zu geringen Signaländerung, nicht quantifizieren. Die Dissoziationskonstante von PPC10 wies wiederum auf eine normale Bindung an FBP11-WW1 hin, allerdings zeigte das äquivalente Spot-Peptid ein deutlich schwächeres Bindungssignal. Es wird davon ausgegangen, daß dieser Effekt keine synthesebedingte Folge unterschiedlicher Peptid-Konzentrationen auf der Cellulosemembran darstellt (Abschnitt III.1.5.6). Vielmehr ist zu vermuten, daß die Anwesenheit des C-terminalen Cysteins in PPC10 zu einer umgekehrten Orientierung des Liganden im Komplex mit der WW-Domäne führte, die ggf. auf der zweifachen Pseudosymmetrie der Polyprolin-II-Helix beruht (vgl. Abschnitt III.2.4, Zarrinpar & Lim, 2000). Wahrscheinlich ist diese alternative Möglichkeit der Bindung nur für die löslichen Liganden gegeben, während die C-terminale Immobilisierung der Spot-Peptide auf der Cellulosemembran diese Orientierung ausschließt.

In Bezug auf ihre Affinität zu FBP11-WW1 stellen somit alle untersuchten Peptidliganden, mit Ausnahme von PPC7, PPC8, PPC9 und CTR-N, mögliche Kandidaten für eine Disulfidverbrückung mit einer geeigneten Cystein-Variante der WW-Domäne dar, da ihre Bindungseigenschaften auch in Gegenwart der Cysteinsubstitution im Wesentlichen erhalten blieb. Da jedoch eine höhere Affinität von Vorteil sein sollte, läßt sich die Präferenz auf die Liganden mit N-terminalem Cystein legen.

### III.3.4. Kovalente Kopplung von WW-Domäne und prolinreichem Ligand

Nachdem sich gezeigt hatte, daß die Cystein-Varianten der isolierten WW-Domäne sowie von prolinreichen Peptidliganden strukturelle Integrität und - damit verbunden - Bindungsaktivität aufwiesen, war es notwendig, ein Verfahren zu etablieren, mit dem die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen beiden Komponenten detektiert und ggf. auch quantifiziert werden konnte.

#### III.3.4.1. Versuche zur Verbrückung auf Peptid-Spot-Membranen

Da eine Analyse von möglichst vielen Kombinationen der WW-Domäne mit prolinreichen Liganden angestrebt wurde, lag ein Ansatz unter Verwendung einer immobilisierten Peptidbibliothek nahe, wie sie bereits für Bindungsstudien an FBP11-WW1 eingesetzt wurde (Abschnitt III.1.5.7). Die Methode der Bindungsanalyse anhand von Spot-Membranen mußte dazu so modifiziert werden, daß sie den Nachweis kovalent gebundener WW-Domänen-Moleküle ermöglichte. Der Grundidee bestand darin, nach der Inkubation der WW-Domäne mit der Spot-Membran (Bindung und ggf. Kopplung), die nicht-kovalent gebundenen Moleküle durch Waschen unter nicht-reduzierenden, denaturierenden Bedingungen von der Membran zu entfernen. Die zu den Peptidliganden disulfidverbrückten Moleküle sollten davon nicht beeinträchtigt sein und könnten wie beschrieben detektiert werden. In Konsequenz müßten diese sich nachfolgend unter reduzierenden, denaturierenden Bedingungen von der Spot-Membran waschen lassen. Anhand dieses Verfahrens sollten sich Peptidliganden identifizieren lassen, die für eine kovalente Kopplung an die WW-Domäne prädestiniert sind. Die experimentelle Durchführung dieser Versuche erfolgte gleichzeitig für die Varianten WW-wt, WW-D24C sowie WW-K35C und ist mit den Ergebnissen in Tabelle 15 zusammengefaßt.

**Tabelle 15:** Analyse der Bindung und oxidativen Disulfidverbrückung von WW-wt, WW-D24C und WW-K35C mit immobilisierten Peptidliganden. Die Peptidsequenzen sind aus Abbildung 33 ersichtlich.

Inkubationsbedingungen	WW-wt	WW-D24C	WW-K35C
1 $\mu$ M biotinylierte WW-Domäne 50 mM TrisHCl, pH 8.0 500 mM NaCl 1 $\mu$ M CuCl <sub>2</sub> 16 h, 4°C Belichtung: 15 s			
6 M GdnHCl, pH 4.5 3 h, 25°C Belichtung: 15 s			
6 M GdnHCl, pH 7.5 100 mM DTT 3 h, 25°C Belichtung: 1 min			



Die Inkubation der immobilisierten Peptidbibliothek mit den biotinylierten WW-Domänen resultierte zunächst in den bereits beschriebenen Bindungssignalen, die je nach Ligand unterschiedlich intensiv ausfielen. (Tabelle 15 oben bzw. Abschnitt III.3.2.2). Nach dem Waschen der Membranen in 6 M GdnHCl bei pH 4.5 (denaturierende, nicht-reduzierende Bedingungen) konnte anhand eines Vergleichs der Signale für WW-wt mit denen der Cystein-Varianten zwischen (nicht-kovalenter) Bindung und kovalenter Kopplung differenziert werden. Im Kontroll-Experiment mit WW-wt zeigten sich nach dem denaturierenden Waschen an fast allen Positionen keine Bindungssignale mehr. Dieses Verhalten wurde erwartet, da WW-wt kein Cystein enthält (Tabelle 15 Mitte).

Eine Ausnahme bildete allerdings Position E8, an der sich der cysteinfreie Ligand P<sub>6</sub>LPP befand. Da das an dieser Stelle beobachtete Signal nicht auf eine Disulfidverbrückung zurückgeführt werden konnte, wurde angenommen, daß die WW-Domäne an diesen Spot zwar nicht kovalent gekoppelt, aber zumindest sehr fest adsorbiert war. Auch nach dem reduzierenden Waschen mit 6 M GdnHCl, pH 7.5 in Gegenwart von 100 mM DTT, schien an diesem Spot noch biotinylierte WW-wt vorhanden zu sein. Die Varianten WW-D24C und WW-K35C zeigten nach dem reduzierenden Waschen ähnliche Phänomene (Tabelle 15 unten). Über die Ursache der in nahezu allen Versuchen beobachteten Adsorption der WW-Domäne an bestimmten Positionen kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. So weisen die Spots synthesebedingt sehr hohe lokale Peptidkonzentrationen auf, die zu einem Aviditätseffekt in Bindungsexperimenten führen können. Dieser äußert sich ggf. in einer verminderten Dissoziation des Bindungspartners von der Spot-Membranoberfläche und täuscht auf diese Weise eine zu hohe Affinität vor (Kramer et al., 1999). Allerdings blieb unklar, warum sich dieser Effekt besonders deutlich an der Position des Liganden P<sub>6</sub>LPP zeigte, dessen Affinität zumindest in einigen Fällen nicht signifikant höher als die der abgeleiteten Cystein-Varianten sein sollte (vgl. Abschnitt III.3.3).

Mit der entsprechenden Vorsicht waren daher die Signale der kovalent gekoppelten Varianten WW-D24C und WW-K35C zu bewerten, die nach dem nicht-reduzierenden Waschen der Membranen beobachtet wurden. Diese konnten im Wesentlichen einer tatsächlichen Disulfidverbrückung mit den Peptiden der Spot-Membran zugeschrieben werden, da das zu erwartende Ausmaß der Adsorption aus dem Kontroll-Experiment mit WW-wt abschätzbar war. Diese Vermutung bestätigte sich nach dem Waschen unter reduzierenden Bedingungen im Verschwinden des überwiegenden Teils der Signale (Tabelle 15 unten). Dabei schien die Disulfidverbrückung der WW-Domäne eine direkte Folge ihrer Bindung zu sein, da die kovalent gebundenen Varianten WW-D24C und WW-K35C im Wesentlichen nur an den Positionen detektiert wurden, an denen zuvor auch eine (nicht-kovalente) Bindung beobachtet worden war.

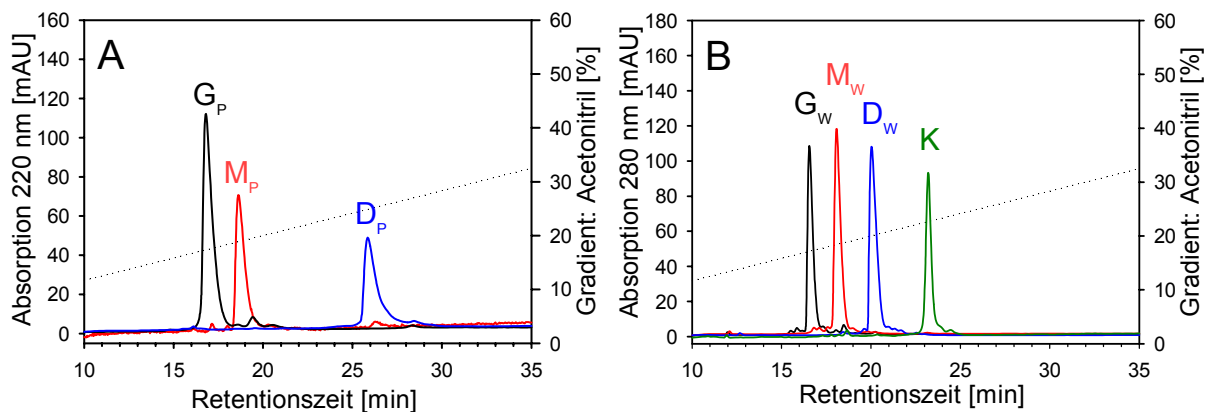
Anhand der hier vorgestellten Experimente zur kovalenten Kopplung der WW-Domäne an immobilisierte Peptide kristallisierten sich keine spezifischen Liganden heraus, die besonders geeignete Kandidaten zur Disulfidverbrückung darstellen würden. Zu diesem Zweck mußten andere Verfahren der Selektion herangezogen werden (Abschnitt III.3.4.3). Jedoch kann resümiert werden, daß die spezifische Affinität der WW-Domäne zum prolinreichen Liganden offensichtlich eine notwendige Voraussetzung für die effiziente Kopplung an selbigen darstellt. Zumindest innerhalb der hier verwendeten Peptidbibliothek wurden keine Peptide identifiziert, die ohne Bindungsaktivität eine signifikante Disulfidverbrückung zur WW-Domäne zeigten.

#### III.3.4.2. Verbrückung in Lösung - Etablierung der HPLC-Analytik

Eine Unterscheidung von nicht-kovalenter Bindung und kovalenter Kopplung, im vorliegenden Fall in Form einer Disulfidbrücke, läßt sich unter denaturierenden Bedingungen bewerkstelligen, wie bereits die Kopplungsexperimente an Spot-Membranen zeigten (Abschnitt III.3.4.1). Dabei wird die nicht-kovalente Wechselwirkung infolge der Entfaltung der Bindungspartner



aufgehoben. Läßt sich trotzdem ein Assoziat nachweisen, so kann von einer kovalenten Bindung zwischen beiden Komponenten ausgegangen werden. Für Proteine kann diese Analytik beispielsweise durch Vergleich ihres Laufverhaltens im reduzierenden und nicht reduzierenden SDS-Gel durchgeführt werden (Abschnitt III.3.5.3). Die geringen Molekularmassen der isolierten WW-Domänen ( $\sim 4$  kDa) und der prolinreichen Liganden ( $\sim 1$  kDa) erlauben jedoch keine effiziente Trennung der Komponenten von ihrem Kopplungsprodukt ( $\sim 5$  kDa) anhand der genannten Methode. Dagegen gelang die Analyse durch Separation der Spezies mit Hilfe einer Reversed-Phase-HPLC-Säule unter denaturierenden Bedingungen (Abschnitt II.10.7).



**Abbildung 49:** Exemplarische Chromatogramme der RP-HPLC-Auftrennung der Spezies, die bei der kovalenten Kopplung von WW-Domäne und prolinreichem Ligand durch Disulfidverbrückung auftreten. **(A)** Am Beispiel des prolinreichen Liganden PPC4 (Auftrag: 18  $\mu$ g) sind das reduzierte Monomer ( $M_P$ ), durch Luftsauerstoff oxidiertes Dimer ( $D_P$ ) sowie das gemischte Disulfid mit Glutathion ( $G_P$ ) gezeigt. **(B)** WW-Domänen-Spezies am Beispiel von WW-K35C (Auftrag: 7  $\mu$ g): reduziertes Monomer ( $M_W$ ), oxidiertes Dimer ( $D_W$ ), gemischtes Disulfid mit Glutathion ( $G_W$ ) sowie der disulfidverbrückte Komplex ( $K$ ) von WW-Domäne und dem prolinreichen Liganden PPC4. Die jeweiligen Retentionszeiten der beobachteten Spezies sämtlicher Liganden und WW-Domänen sind aus Tabelle 24 im Anhang ersichtlich.

Abbildung 49 zeigt exemplarisch, daß sich die Monomere der isolierten WW-Domäne und des prolinreichen Liganden, ihre Homodimere, die Heterodimere (entspricht dem gewünschten Kopplungsprodukt) sowie die gemischten Disulfide mit Glutathion (Abschnitt III.3.4.3) anhand ihres Elutionsverhaltens in fast allen Fällen gut unterscheiden ließen. Die hohe Trennleistung der analytischen HPLC sowie die unterschiedlichen spektralen Eigenschaften von WW-Domäne und prolinreichen Peptidliganden - letztere enthielten keine Aromaten - erlaubte in vielen Fällen eine vollständige Zuordnung und Quantifizierung der im Verlauf der Kopplungsreaktion auftretenden Spezies. Die Retentionszeiten aller untersuchten Kombinationen der Cystein-Varianten von WW-Domäne und Liganden sind in Tabelle 24 im Anhang aufgeführt. Die Identifizierung einiger nicht eindeutiger Peaks erfolgte ggf. durch Massenspektrometrie (Tabelle 21 im Anhang).


### III.3.4.3. Analyse der Stabilisierung des disulfidverbrückten Komplexes

Bei den in Abschnitt III.3.4.1 beschriebenen Kopplungsexperimenten anhand von Spot-Membranen erfolgte die Disulfidverbrückung der WW-Domänen mit den Liganden durch Oxidation vermittelt durch Luftsauerstoff. Dieser Prozeß, der durch Spuren von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen im Puffer katalysiert werden kann (Ahmed et al., 1975), führte im Verlauf der Reaktion zu einer fortschreitenden kovalenten Kopplung der WW-Domäne an die Peptidliganden ohne Gleichgewichtseinstellung, da der Elektronenakzeptor (Sauerstoff der Luft) nahezu unlimitiert zur Verfügung stand. Ein Vergleich der Kopplungseigenschaften der verschiedenen Peptidliganden zur WW-Domäne ist unter diesen Bedingungen jedoch nicht möglich. Der Einsatz eines Redoxsystems, wie z.B. einem Gemisch aus oxidiertem und reduziertem Glutathion, erlaubt dagegen die Einstellung definierter Redoxbedingungen (Creighton, 1984). Diese bleiben unter bestimmten Voraussetzungen über den Verlauf der Kopplung konstant und

gestatten somit die Analyse der Disulfidverbrückung im Gleichgewicht. Die Lage dieses Gleichgewichtes wird durch die Gleichgewichtskonstante bestimmt und erlaubt eine Beurteilung der gebildeten Komplexe bezüglich der Tendenz ihrer Bildung und Stabilität.

Die für die Kopplungsreaktionen verwendeten Redoxbedingungen sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Sie umfassen einen Bereich von oxidierenden Bedingungen ( $\sim -150$  bis  $-170$  mV), wie sie im Endoplasmatischen Retikulum eukaryontischer Zellen bzw. im Periplasma von Bakterien herrschen, bis zu Bedingungen ( $\sim -300$  mV), die bereits reduzierender als z.B. das Cytoplasma ( $\sim -240$  mV) sind (Sevier & Kaiser, 2002).

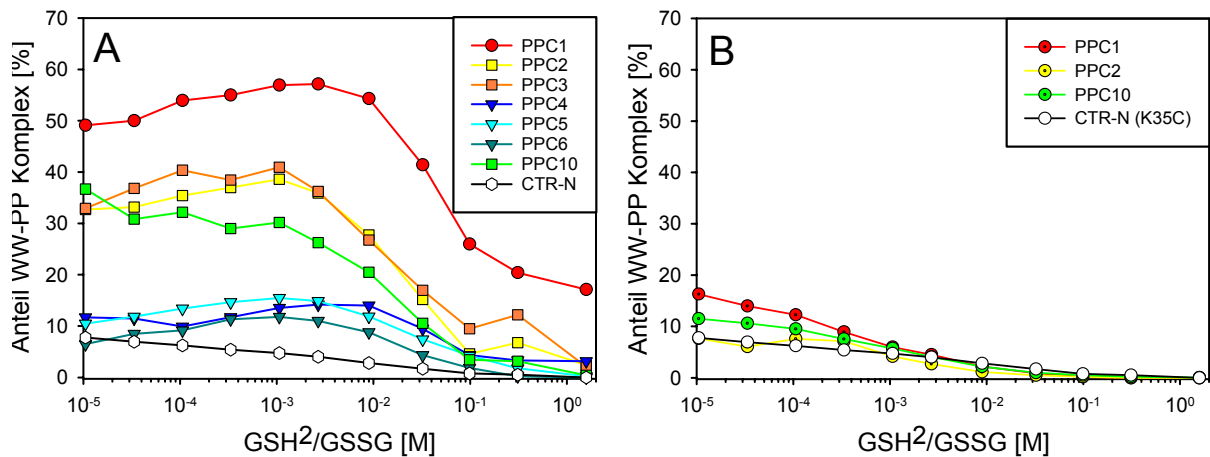
**Tabelle 16:** Redoxbedingungen des Puffers in Abhängigkeit der Konzentrationen von reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH bzw. GSSG) bei pH 8.0

GSH [mM]	GSSG [mM]	GSH <sup>2</sup> /GSSG [M]	Redoxpotential <sup>1,2</sup>	
0.20	3.80	$1,05 \cdot 10^{-5}$	-152 mV	
0.35	3.65	$3,36 \cdot 10^{-5}$	-167 mV	
0.60	3.40	$1,06 \cdot 10^{-4}$	-181 mV	
1.00	3.00	$3,33 \cdot 10^{-4}$	-196 mV	
1.60	2.40	$1,07 \cdot 10^{-3}$	-211 mV	
2.20	1.80	$2,69 \cdot 10^{-3}$	-223 mV	
3.00	1.00	$9,00 \cdot 10^{-3}$	-238 mV	
3.60	0.40	0,03	-255 mV	
3.85	0.15	0,10	-269 mV	
3.95	0.05	0,31	-284 mV	
3.99	0.01	1,59	-305 mV	

<sup>1</sup> berechnet nach Gleichung 10 (Abschnitt II.12.6)

<sup>2</sup> bei pH 8.0, 25°C mit  $E^\circ$  für GSSG/GSH = -299 mV (Clark, 1960; Rost & Rapoport, 1964)

Die Kopplungsreaktionen von 30  $\mu$ M WW-D24C bzw. WW-K35C mit 100  $\mu$ M der prolinreichen Liganden PPC1 bis PPC6, PPC10 sowie der Negativkontrolle CTR-N wurden in Gegenwart von insgesamt 4 mM des Glutathion-Redoxsystems bei pH 8 ('WW-Puffer TB' + 1 mM EDTA, 25°C) durchgeführt. Die Einstellung des Gleichgewichtes war nach 30-60 min beendet (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Kopplungsansätze erfolgte nach 75 min, nachdem die Reaktion durch Zugabe von 1 % (v/v) TFA abgestoppt wurde. Die Liganden PPC7, PPC8 und PPC9 wurden nicht eingesetzt, da ihre Bindung zur WW-Domäne nicht vorhanden bzw. nicht nachweisbar war (Abschnitt III.3.3). Die Quantifizierung des disulfidverbrückten Komplexes sowie der übrigen beobachteten Spezies ist in Abschnitt III.3.4.2 beschrieben.



**Abbildung 50:** Analyse der Stabilität der disulfidverbrückten Komplexe der verschiedenen prolinreichen Liganden (siehe Legende) mit **(A)** WW-K35C und **(B)** WW-D24C unter verschiedenen Redoxbedingungen. Der Kopplungsansatz enthielt 30  $\mu\text{M}$  WW-Domäne, 100  $\mu\text{M}$  Ligand und 4 mM Glutathion (vgl. Tabelle 16) in 'WW-Puffer TB' + 1 mM EDTA bei 25°C. Die Quantifizierung des Komplexes erfolgte nach 1h 15 min durch RP-HPLC-Auftrennung und Peakflächenintegration. Die Angabe des Komplexanteils wurde dabei auf die eingesetzte Konzentration der WW-Domäne bezogen.

Aus Abbildung 50 ist der Einfluß der Redoxbedingungen auf den Anteil des gebildeten kovalenten Komplexes von WW-Domäne und Ligand ersichtlich. Die Tendenz der beiden WW-Varianten mit den Peptiden eine Disulfidbrücke einzugehen, unterschied sich dabei deutlich, sowohl im Vergleich verschiedener Liganden als auch zwischen WW-D24C und WW-K35C. Erwartungsgemäß war in den meisten Ansätzen die Ausbeute kovalenten Komplexes unter reduzierenden Bedingungen am niedrigsten und im oxidierenden Bereich am höchsten. Allerdings wurde dabei im Fall der meisten Peptidliganden offensichtlich ein Optimum bei einem Redoxpotential durchlaufen, das bereits deutlich in Richtung reduzierende Bedingungen verschoben war ( $\text{GSH}^2/\text{GSSG} \sim 10^{-3} \text{ M}$ ). Außerdem fiel auf, daß selbst unter den oxidierendsten Bedingungen der Analyse ( $\text{GSH}^2/\text{GSSG} \sim 10^{-5} \text{ M}$ ), trotz des Überschusses des Liganden zur WW-Domäne, in keinem Fall der Ansätze eine quantitative Kopplung der WW-Domäne erreicht werden konnte. Unter diesen Bedingungen wurden stattdessen die gemischten Disulfide von WW-Domäne und prolinreichem Ligand populiert, die in dieser Form nicht mehr der Komplexbildung zur Verfügung standen (Abbildung 54). Das bedeutet auch, daß bei den hier eingesetzten Konzentrationen der Reaktanden die Wechselwirkungen zwischen Glutathion und der WW-Domäne bzw. dem prolinreichen Liganden nicht zu vernachlässigende Dimensionen annehmen, die im Rahmen der quantitativen Bewertung berücksichtigt werden müssen (vgl. Abschnitt III.3.4.5).

Im Fall von WW-K35C wurde die höchste Komplexausbeute mit dem Ligand PPC1 beobachtet, gefolgt von PPC2 und PPC3 (Abbildung 50 A und Tabelle 17). Diesen Liganden ist gemeinsam, daß sie zum einen die Position des Cysteins N-terminal zur prolinreichen Sequenz aufweisen und andererseits Aminosäuren (Glycin/Serin) enthalten, die zwischen Cystein und dem Bindungsmotiv vermutlich als *spacer* fungieren. Auch im Fall von PPC10, das ein C-terminales Cystein aufweist und ein Glycin zwischen Cystein und dem PPLPP-Motiv enthält, war die Komplexbildung offensichtlich begünstigt. Wie der Vergleich von PPC2 und PPC3 dagegen zeigte, schienen die Affinitätsunterschiede der nicht-kovalenten Bindung an die WW-Domäne (mit  $K_{\text{D PPC2}} = 245 \pm 15 \mu\text{M}$  und  $K_{\text{D PPC3}} = 132 \pm 6 \mu\text{M}$ , Abschnitt III.3.3) keinen signifikanten Einfluß auf die Stabilität der entsprechenden kovalenten Komplexe zu haben. Auffallend war auch, daß der Komplex WW-K35C-PPC1 auch unter reduzierenden Bedingungen ( $\text{GSH}^2/\text{GSSG} \sim 1.6 \text{ M}$ ) noch zu etwa 20% populiert war, was für PPC2 und PPC3 nicht beobachtet wurde. Die übrigen Liganden PPC4, PPC5 und PPC6 mit internen Cysteinen schienen deutlich schlechter Disulfidbrücken mit WW-K35C einzugehen, während das Peptid CTR-N, das kein

Polyprolinmotiv enthielt, die geringste Tendenz dazu hatte. Letzteres wurde als Negativkontrolle verwendet und zeigte, daß die N-terminale Position des Cysteins kein hinreichendes Kriterium für eine signifikante Kopplung eines Peptids an die WW-Domäne darstellt.

**Tabelle 17:** Maximale Komplexausbeuten der Disulfidverbrückung von 30  $\mu\text{M}$  WW-K35C bzw. WW-D24C mit 100  $\mu\text{M}$  der verschiedenen prolinreichen Liganden im Gegenwart von 4 mM Glutathion-Redoxsystem.

Ligand	Aminosäure-Sequenz	Komplex mit WW-K35C [%] <sup>1,2</sup>	Komplex mit WW-D24C [%] <sup>1,2</sup>
PPC1	S GCG SGS GSP PPP PPL P	57.1	4.5
PPC2	CSG PPP PPP PPL P	35.9	2.7
PPC3	CSG PPP PPP PPL PP	36.2	- <sup>3</sup>
PPC4	GCP PPP PPL P	14.2	- <sup>3</sup>
PPC5	SGC PPP PPL PP	14.9	- <sup>3</sup>
PPC6	GPP CPP PPL P	11.0	- <sup>3</sup>
PPC10	GPP PPL PPG C	26.3	4.0
CTR-N	CGL GPG LGP G	4.0	- <sup>3</sup>

<sup>1</sup> bezogen auf 30  $\mu\text{M}$  WW-Domäne im Ansatz

<sup>2</sup> bei  $\text{GSH}^2/\text{GSSG}=2.7 \cdot 10^{-3}$  M (entspricht: 2.2 mM GSH, 1.8 mM GSSG)

<sup>3</sup> nicht bestimmt

Die Analyse der Komplexbildungseigenschaften von WW-D24C ergab im Vergleich zu WW-K35C ein deutlich anderes Bild. Disulfidverbrückte Komplexe zwischen prolinreichen Liganden und WW-D24C konnten zwar ebenfalls detektiert werden, jedoch waren sie in deutlich geringerem Ausmaß populiert und zeigten keinerlei Stabilisierung unter stärker reduzierenden Bedingungen (Abbildung 50 B). Dabei schien auch die Cysteinposition im Ligand keine wesentliche Rolle zu spielen, denn PPC1, PPC2 und PPC10 verhielten sich im Komplex mit WW-D24C unter Redoxbedingungen ähnlich wie die Negativkontrolle CTR-N. Offensichtlich wurde die Affinität von WW-D24C zu prolinreichen Liganden durch die kovalente Bindung mit selbigen soweit beeinträchtigt bzw. aufgehoben, daß der Komplexbildung keine stabilisierende Wechselwirkung mehr zugrunde lag. So ist es denkbar, daß die geringe Redoxstabilität dieser Komplexe ursächlich mit einer Entfaltung der WW-Domäne infolge der kovalenten Kopplung in Zusammenhang steht (Abschnitt IV.2.2).

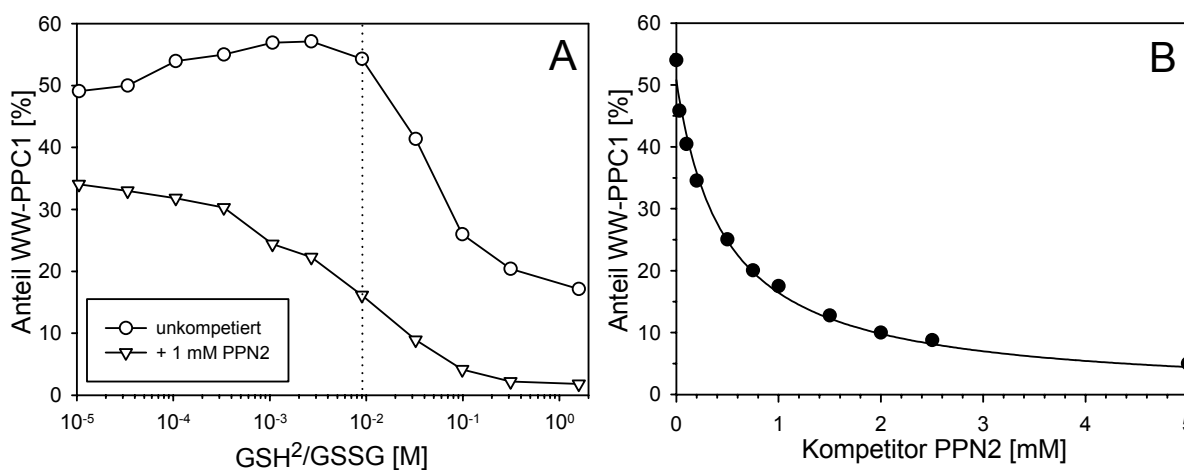
Aus diesen Untersuchungen wurden wesentliche Erkenntnisse für eine WW/Polyprolin-stabilisierte Disulfidbrücke abgeleitet. Zunächst scheint lediglich die FBP11-WW1-Variante WW-K35C für eine derartige Kopplung geeignet zu sein. Außerdem ist die Anwesenheit einer prolinreichen Sequenz erforderlich, deren Affinität zur WW-Domäne die Basis für die Stabilisierung darstellt. Zudem sollte das für die Kopplung benötigte Cystein das Bindemotiv nur flankieren (idealerweise im Abstand von mehreren *spacer*-Aminosäuren, wie z.B. Glycin/Serin) und nicht innerhalb der Polyprolin-Sequenz liegen. Und letztendlich scheint sowohl die N- als auch C-terminale Position des Cysteins möglich zu sein, wobei im Rahmen der hier durchgeführten Analysen, der Schwerpunkt auf Liganden mit N-terminal positioniertem Cystein lag

#### III.3.4.4. Spezifität der Stabilisierung

Die Beobachtung, daß der kovalente Komplex der WW-Domäne mit dem Peptid CTR-N, das keine Polyprolinsequenz enthielt, keine Stabilität unter reduzierenden Bedingungen aufwies, legte bereits die Vermutung nahe, daß die Bindungsaffinität der WW-Domäne zu prolinreichen

Liganden für die Stabilisierung der jeweiligen kovalenten Komplexe verantwortlich ist (Abschnitt III.3.4.3). Um diese Schlußfolgerung weiter zu untermauern, wurde die Stabilisierung des kovalenten Komplexes von WW-K35C und PPC1 in Abhängigkeit von der Konzentration eines Kompetitors der Bindung untersucht. Bei vollständiger Inhibition der Bindung von WW-K35C zu PPC1 durch geeignete Konzentrationen von PPN2 müßte die Stabilisierung der Disulfidbrücke aufgehoben werden und der Komplex ein Verhalten ähnlich der Negativkontrolle (WW-K35C-CTR-N) aufweisen.

Zunächst wurde die Komplexbildung in Gegenwart von 1 mM PPN2 untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Verringerung der Komplexausbeute unter sämtlichen Redoxbedingungen, wobei unter oxidierenden Bedingungen noch 34 % der WW-Domäne im Komplex mit PPC1 vorlag, während unter reduzierenden Bedingungen die Ausbeute auf 2 % herabgesetzt war (Abbildung 51 A). Der maximale Unterschied der Komplexanteile wurde, unter leicht reduzierenden Bedingungen ( $\text{GSH}^2/\text{GSSG} \sim 0.009 \text{ M}$ ), mit einer Verminderung von 54 % auf 16 % WW-K35C-PPC1 beobachtet.



**Abbildung 51:** Spezifitätsnachweis der Disulfidverbrückung durch Konkurrenz der kovalenten Kopplung von WW-K35C mit einem (nicht-kovalent bindenden) Kompetitor der Bindung (PPN2) in 'WW-Puffer TB' + 1 mM EDTA bei 25°C. **(A)** Redoxabhängige Inhibition der kovalenten Komplexbildung von 30  $\mu\text{M}$  WW-K35C und 100  $\mu\text{M}$  PPC1 in Gegenwart von 1 mM PPN2. **(B)** Verringerung der Komplexbildung zwischen 30  $\mu\text{M}$  WW-K35C und 100  $\mu\text{M}$  PPC1 bei einem Redoxpotential von -238 mV (3 mM GSH/1 mM GSSG, gestrichelte Linie in Abbildung 51 A) in Abhängigkeit von der PPN2-Konzentration im Kopplungsansatz. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand eines 1:1 Bindungsmodells unter Einbeziehung eines kompetitiven Inhibitors.

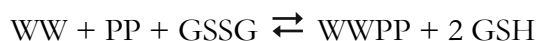
Diese Redoxbedingungen wurden im Folgenden gewählt, um eine quantitative Wettbewerbsanalyse der Kopplung von WW-K35C und PPC1 durchzuführen. Dabei wurde die Komplexausbeute in Abhängigkeit von der PPN2-Konzentration im Bereich von 0 bis 5 mM untersucht (Abbildung 52 B) und nach dem Modell einer 1:1 Bindung in Gegenwart eines kompetitiven Inhibitors ausgewertet (Abschnitt II.12.3). Die darin enthaltene Inhibitionskonstante  $K_i$  entspricht dabei der Dissoziationskonstante  $K_D$ , die für die Bindung von PPN2 an die WW-Domäne bestimmt wurde (WW-wt,  $152 \pm 3 \mu\text{M}$ , Abschnitt III.1.5.2). Durch Kenntnis dieser Größe ließ sich eine apparente Dissoziationskonstante  $K_D'$  für PPC1 im Rahmen der reversiblen, kovalenten Interaktion mit WW-K35C bestimmen. Analog zur Dissoziationskonstante der nicht-kovalenten Bindung von PPC1 an FBP11-WW1 (WW-AKSM,  $K_D = 219 \pm 24 \mu\text{M}$ , Abschnitt III.3.3) ist  $K_D'$  ebenfalls ein Maß für die Affinität der Bindung zwischen PPC1 und WW-K35C, die jedoch durch die Disulfidbrücke kovalent stabilisiert wird. Unter den gewählten Redoxbedingungen wurde für  $K_D'$  ein Wert von  $44 \pm 5 \mu\text{M}$  bestimmt. Das bedeutete, daß die Disulfidbrücke eine Stabilisierung der Bindung etwa um den Faktor 5 bewirkte. Diese Stabilisierung läßt sich weiterhin in Form einer Differenz der freien Energie

ausdrücken (Gleichung 8, Abschnitt II.12.4), die mit  $\Delta\Delta G=4.3$  kJ/mol bestimmt wurde. Dieser Wert erscheint für eine kovalente Wechselwirkung zunächst gering, jedoch muß berücksichtigt werden, daß er lediglich für Redoxbedingungen gilt, unter denen die Ausbildung der Disulfidbrücke deutlich reversiblen Charakter aufweist. Das Redoxpotential entsprach dabei einem reduzierenden Milieu, wie es z.B. im Cytosol von Zellen vorliegt ( $\sim 240$  mV, Sevier & Kaiser, 2002). Unter oxidierenden Verhältnissen müßte sich die Komplexbildung von WW-Domäne und Ligand dagegen nur in geringerem Ausmaß kompetitieren lassen, da unter diesen Bedingungen das Gleichgewicht der Disulfidverbrückung auf der Seite des Disulfides liegt (vgl. Abbildung 51 A).

Anhand der beschriebenen Konkurrenzexperimente ließ sich nachweisen, daß die Stabilisierung der Disulfidbrücke im kovalenten WW-Ligand-Komplex im Wesentlichen durch die Affinität der WW-Domäne zum Ligand vermittelt wird (Spezifität der Stabilisierung). Durch Konkurrenz dieser Wechselwirkung zeigte sich eine deutlich verminderte Tendenz zur Ausbildung dieser Disulfidbrücke.

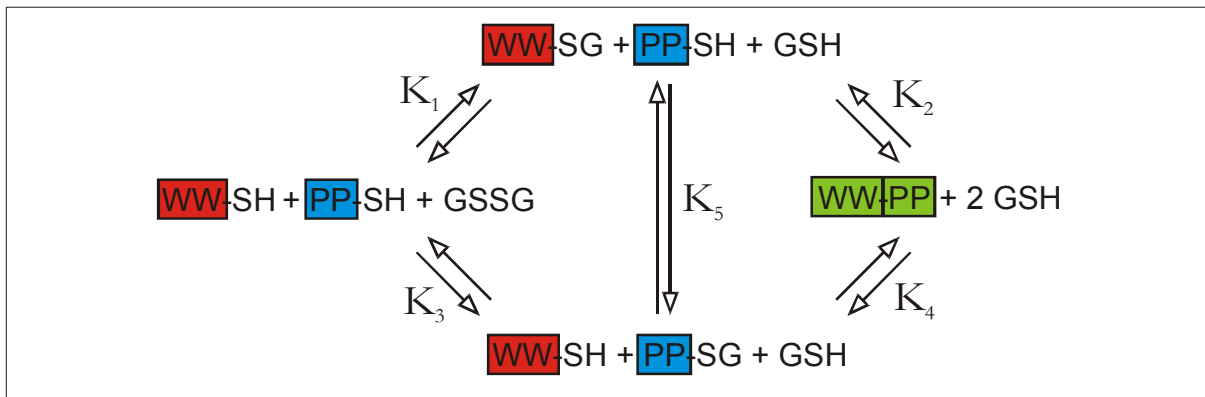
#### III.3.4.5. Das Redoxpotential der WW-Polyprolin-Disulfidbrücke

Wie bereits erörtert, läßt sich die Stabilität bzw. Bildungstendenz der Disulfidbrücke zwischen WW-Domäne und prolinreichem Ligand durch Variation der Redoxbedingungen analysieren. Dabei hatte sich bereits herausgestellt, daß die Liganden PPC1, PPC2 und PPC3 offensichtlich dazu in der Lage waren, stabilere disulfidverbrückte Komplexe mit WW-K35C einzugehen als andere (Abschnitt III.3.4.3). Die für die disulfidstabilisierte Bindung von PPC1 an WW-K35C ermittelte apparente Dissoziationskonstante erfaßt das Ausmaß der Stabilisierung jedoch nur für die untersuchten, reduzierenden Bedingungen (Abschnitt III.3.4.4). Allgemeiner dagegen läßt sich der Einfluß der WW-Polyprolin-Bindung auf die Ausbildung der Disulfidbrücke anhand ihres Redoxpotentials ausdrücken. Dieses ist Ausdruck für das Bestreben der reduzierten WW-Domäne mit dem (ebenfalls) reduzierten Polyprolinligand, unter Übertragung von zwei Elektronen auf einen geeigneten Elektronenakzeptor, eine Disulfidbrücke einzugehen. Im vorliegenden Fall stellte oxidiertes Glutathion den Elektronenakzeptor (Oxidationsmittel) dar (siehe auch Abschnitt II.12.6). In ihrer Bilanz läßt sich die Reaktion folgendermaßen ausdrücken:



Die Bestimmung des Redoxpotentials anhand der Nernstschen Gleichung erfordert die Kenntnis der Gleichgewichtskonstante  $K$  dieser Redoxreaktion, in die sämtliche oxidierte und reduzierte Spezies mit ihren jeweiligen Konzentrationen eingehen (Abschnitt II.12.6).

In den RP-HPLC-Analysen der Disulfidverbrückung zeigte sich jedoch, daß die gemischten Disulfide von WW-Domäne und Ligand mit Glutathion ebenfalls signifikant populiert werden (Abbildung 54). Demzufolge gingen diese Spezies ebenfalls in die Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion ein, was sich in einem nunmehr komplexeren Reaktionsschema äußerte (Abbildung 52).



**Abbildung 52:** Schema der erwarteten Gleichgewichte, die bei der kovalenten Kopplung der WW-Domäne (rot) mit einem prolinreichen Liganden (blau) zu einem disulfidverbrückten Komplex (grün) in Gegenwart eines Glutathion-Redoxsystems (GSSG bzw. GSH) auftreten. Die Herleitung des Schemas basiert auf der experimentellen Identifikation der im Verlauf der Kopplungsreaktion populierten Spezies. Die Gesamtreaktion der Kopplung kann dabei in fünf Gleichgewichte zerlegt werden, deren Lage die Gleichgewichtskonstanten K<sub>1</sub> bis K<sub>5</sub> angeben.

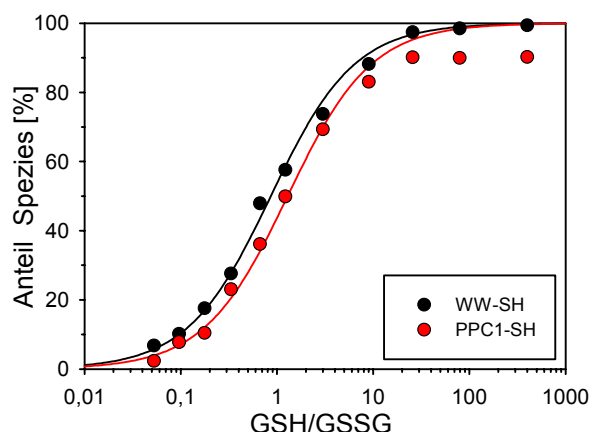
Dabei wurden fünf separate Gleichgewichtsreaktionen formuliert, die jeweils durch ihre entsprechende Gleichgewichtskonstanten (K<sub>1</sub> bis K<sub>5</sub>) charakterisiert werden. Die Bildung des disulfidverbrückten Komplexes aus WW-Domäne und Ligand ist dabei auf mehreren Wegen möglich. So werden in den Reaktionen 1 und 3 die gemischten Disulfide der WW-Domäne (WW-SG) und dem prolinreichen Ligand (PP-SG) ausgehend von den reduzierten Spezies (WW-SH, PP-SH) und GSSG gebildet, bei denen pro gebildetes Disulfid ein Elektron auf Glutathion übertragen wird. In den Reaktionen 2 und 4 werden die entsprechenden Bindungspartner in reduzierter Form (PP-SH bzw. WW-SH) durch die gemischten Disulfide WW-SG bzw. PP-SG oxidiert. Dabei entsteht der disulfidverbrückte Komplex WW-PP und ein weiteres Elektron wird auf Glutathion übertragen. Je nach Lage des Gleichgewichtes sind auch die Rückreaktionen sowie Austauschreaktionen der gemischten Disulfide miteinander möglich (Reaktion 5). Experimentell sind die verschiedenen Wege, auf denen der Komplex WW-PP entstehen kann, jedoch nicht unterscheidbar. Lediglich die Konstanten K<sub>1</sub> und K<sub>3</sub>, die die Bildung der gemischten Disulfide ausgehend von den reduzierten Spezies repräsentieren, lassen sich durch separate Analyse der Gleichgewichte



bestimmen, unter der Voraussetzung, daß die Konzentrationen von WW-SH und PP-SH keinen signifikanten Einfluß auf das Redoxsystem Glutathion haben. Diese Bedingung wurde durch Verwendung eines signifikanten Überschusses von GSSG/GSH (4 mM) im Vergleich zu WW-SH und PP-SH (30 µM bzw. 100 µM) erfüllt.

In Abhängigkeit von den Redoxbedingungen stellte sich ein bestimmtes Verhältnis der Konzentrationen von reduzierter Spezies (WW-SH bzw. PP-SH) und gemischtem Disulfid (WW-SG bzw. PP-SG) ein. Die Entstehung von disulfidverbrückten Homodimeren der WW-Domäne oder dem prolinreichen Ligand wurde unter keinen Bedingungen beobachtet. Die Bestimmung von K<sub>1</sub> und K<sub>3</sub> erfolgte durch Quantifizierung der reduzierten Spezies von WW-K35C und PPC1, deren Anteile gegen das Verhältnis von GSH/GSSG aufgetragen wurde (Abbildung 53).





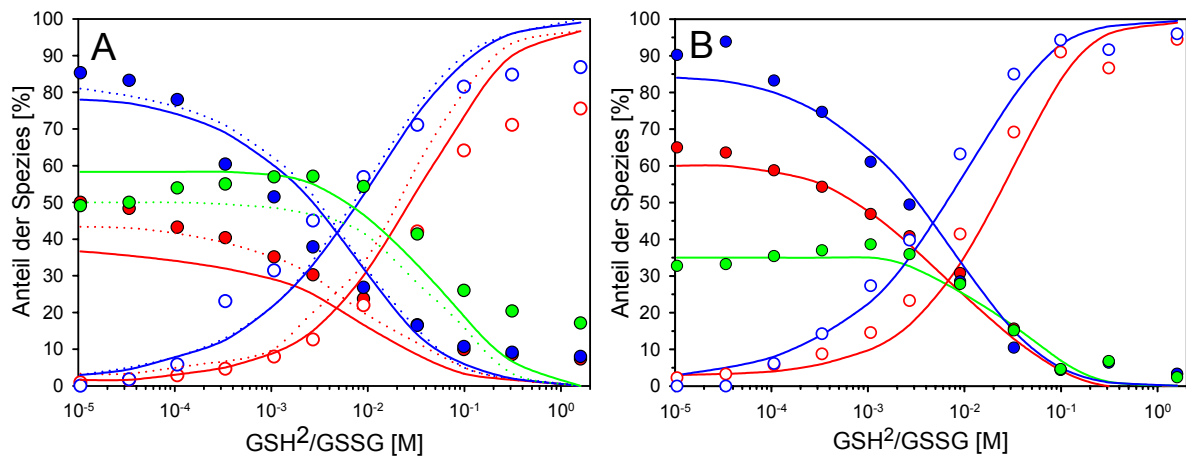
**Abbildung 53:** Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten  $K_1$  und  $K_3$  aus Abbildung 52 durch Analyse der redoxabhängigen Ausbildung gemischter Disulfide von  $30 \mu\text{M}$  WW-K35C bzw.  $100 \mu\text{M}$  PPC1 mit Glutathion ( $4 \text{ mM}$  Gesamtkonzentration GSH+GSSG, 'WW-Puffer TB' +  $1 \text{ mM}$  EDTA,  $25^\circ\text{C}$ ,  $75 \text{ min}$ ). Die Daten wurden an das Modell einer bimolekularen Gleichgewichtsreaktion angepasst.

Für die Bildung von WW-SG wurde die Gleichgewichtskonstante mit  $K_1 = 0.86 \pm 0.04$  bestimmt, während die Analyse der Entstehung von PP-SG für  $K_3$  einen Wert von  $1.29 \pm 0.13$  ergab. Damit lagen beide Gleichgewichtskonstanten im Rahmen der experimentellen Ungenauigkeit etwa bei 1. Die Auflösung der Nernstschen Gleichung (Abschnitt II.12.6) resultiert demzufolge in einem Redoxpotential der Disulfidbrücke in WW-SG bzw. PP-SG, das annähernd identisch mit dem von Glutathion ist ( $E^{\circ'} = -240 \text{ mV}$ ).

Auch in Kenntnis von  $K_1$  und  $K_3$ , waren die Konstanten  $K_2$ ,  $K_4$  und  $K_5$  (Abbildung 52) experimentell nicht separat bestimmbar, da die entstehenden Spezies auf mehreren Wegen gebildet werden konnten und ein entsprechender mathematischer Lösungsansatz im Rahmen dieser Arbeit zu komplex erschien. Jedoch ergab sich aus der Kenntnis der Konzentrationen aller beteiligten Spezies im Gleichgewicht die Möglichkeit, die experimentell erhaltenen Daten zu simulieren und daraus geeignete Gleichgewichtskonstanten abzuleiten. Mit Hilfe des Programms KINSIM (Barshop et al., 1983) erfolgte die Simulation des in Abbildung 52 gezeigten Reaktionsschemas unter Gleichgewichtsbedingungen. Dabei wurden die im Gleichgewicht auftretenden Konzentrationen der beteiligten Spezies unter Annahme bestimmter Werte für  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$ ,  $K_4$  und  $K_5$  simuliert und an die experimentellen Daten angepasst. Die zuvor bestimmten Werte für  $K_1$  und  $K_3$  wurden in die Simulation einbezogen. Die annähernde Übereinstimmung der Werte von  $K_1$  und  $K_3$  implizierte, daß  $K_5 = 1$  gesetzt werden konnte.



Zum Vergleich wurden die experimentell analysierten Kopplungsreaktionen von WW-K35C mit PPC1 sowie PPC2 simuliert (Abbildung 54).



**Abbildung 54:** Vergleich der experimentell bestimmten Anteile der beobachteten Spezies im Gleichgewicht mit den Vorhersagen einer Simulation der Reaktion nach dem in Abbildung 52 gezeigten Schema. Die Prozentangaben (Ordinatenachse) beziehen sich dabei separat auf die eingesetzten Konzentrationen der Reaktion von 30  $\mu\text{M}$  WW-K35C mit **(A)** 100  $\mu\text{M}$  PPC1 und **(B)** 100  $\mu\text{M}$  PPC2 in Gegenwart von 4 mM Glutathion. Zuordnung der Spezies: WW-SH ( $\circ$ ), WW-SG ( $\bullet$ ), PP-SH ( $\circ$ ), PP-SG ( $\bullet$ ), Komplex WW-PP ( $\bullet$ ). Die Linien korrespondieren den prognostizierten Verläufen anhand der Simulationen: **(A)** mit  $K_2/K_4=150$  (durchgezogene Linien) bzw.  $K_2/K_4=100$  (gestrichelte Linien) **(B)** mit  $K_2$  und  $K_4=50$  (durchgezogene Linien). Die Simulationen erforderten in allen Fällen die Annahme von  $K_1$  und  $K_3=2$ .

Dabei konnte prinzipiell eine recht gute Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten Daten erreicht werden, was darauf hinwies, daß das zugrundegelegte Reaktionsschema (Abbildung 52) das experimentell beobachtete Verhalten der beteiligten Spezies recht gut beschreibt. Auffällige Differenzen zeigten sich konkret im Fall der Kopplung von PPC1 an WW-K35C, bei der im Experiment unter reduzierenden Bedingungen der Komplex noch deutlich populiert war. Dieses Verhalten war anhand des genannten Reaktionsschemas nicht erklärbar und wurde demzufolge auch nicht in der Simulation beobachtet (Abbildung 54 A). Für den Komplex der WW-Domäne mit PPC2 zeigte sich dieser Effekt dagegen nicht. Vermutlich liegen der Stabilität des WW-K35C-PPC1-Komplexes zusätzliche Wechselwirkungen zugrunde, so daß eine vollständige Reduktion der dabei involvierten Disulfidbrücke unter den gegebenen Redoxbedingungen nicht erreicht wird. So wäre es möglich, daß die zur Reduktion erforderliche Zugänglichkeit der Disulfidbrücke für reduziertes Glutathion in diesem Komplex sterisch eingeschränkt ist. Das relativ schwach ausgeprägte Maximum der Komplexausbeute, das unter leicht reduzierenden Bedingungen ( $\text{GSH}^2/\text{GSSG} \sim 10^{-3}$  M) durchlaufen wird, konnte in der Simulation ebenfalls nicht beobachtet werden.

Wie aus Abbildung 54 A ersichtlich, können die anhand der Simulation ermittelten Gleichgewichtskonstanten nur als Näherungswerte betrachtet werden (Tabelle 18). So sind z.B. für die Kopplung von PPC1 und WW-K35C die Ergebnisse von zwei Simulationen gezeigt, die den Einfluß des numerischen Wertes von  $K_2$  bzw.  $K_4$  auf die Simulation verdeutlichen. Die dabei ermittelten Konstanten unterschieden sich um den Faktor 1.5 ( $K_2$  und  $K_4 = 150$  bzw.  $K_2$  und  $K_4 = 100$ ), führten aber zu ähnlich guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Für  $K_1$  und  $K_3$  lieferte die Simulation einen Wert von 2, während die experimentell bestimmten Werte ( $K_1$  und  $K_3 \sim 1$ ) die Simulation verschlechterten (Daten nicht gezeigt). Diese Abweichungen sind signifikant und spiegeln sich natürlich im Fehler der daraus abgeleiteten Größen (Redoxpotential, freie Energie) wider, jedoch liefern sie eine korrekte Vorstellung von der Größenordnung der zugrundeliegenden Konstanten.

In die Bestimmung des Redoxpotentials anhand der Nernstschen Gleichung geht die Gleichgewichtskonstante  $K$  der Gesamtreaktion ein (Abschnitt II.12.6). Da die Konstanten einander nachgeschalteter Gleichgewichte sich multiplikativ zur Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion ergeben, gilt für die beiden Parallelwege der Bildung von WW-PP:

$$K = K_1 \cdot K_2 = K_3 \cdot K_4$$

Die anhand von  $K_1$  und  $K_2$  bzw.  $K_3$  und  $K_4$  berechneten Werte für  $K$ , das Redoxpotential der Disulfidbrücke des kovalenten WW-Polyprolin-Komplexes sowie die sich daraus ergebende freie Energie der Redoxreaktion sind aus Tabelle 18 ersichtlich.

**Tabelle 18:** Übersicht der durch Simulation bestimmten Gleichgewichtskonstanten der Kopplungsreaktion der WW-Domäne mit einem prolinreichen Ligand und den daraus errechneten Parametern der Redoxreaktion

Komplex	$K_1, K_3^a$	$K_2, K_4^a$	$K^b$	$E$ [mV] <sup>c</sup>	$E^{o'}$ [mV] <sup>d</sup>	$\Delta E^{o'}$ [mV] <sup>e</sup>	$\Delta G^{o'}$ [kJ/mol] <sup>e</sup>
WWK35C-PPC1 <sup>f</sup>	2	150	300	-372	-313	63	-12.2
WWK35C-PPC1 <sup>g</sup>	2	100	200	-367	-308	58	-11.2
WWK35C-PPC2	2	50	100	-358	-299	49	-9.5

<sup>a</sup> Gleichgewichtskonstanten der Teilreaktionen nach Abbildung 52, bestimmt durch Simulation

<sup>b</sup> Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion ( $K = K_1 \cdot K_2 = K_3 \cdot K_4$ )

<sup>c</sup> Redoxpotential bestimmt mit GSSG/GSH bei pH 8.0 (mit  $E^{o'}_{\text{GSSG/GSH}} = -299$  mV, Rost & Rapoport, 1964)

<sup>d</sup> Standard-Redoxpotential bei pH 7.0

<sup>e</sup> nach Gleichungen 13 und 12 (bzgl. freiem Cystin/Cystein mit  $E^{o'} = -250$  mV, Jones et al., 2000)

<sup>f</sup> Simulation mit  $K_2$  und  $K_4 = 150$  (vgl. Abbildung 54 A)

<sup>g</sup> Simulation mit  $K_2$  und  $K_4 = 100$  (vgl. Abbildung 54 A)

Die Redoxpotentiale der beiden disulfidverbrückten Komplexe von WW-K35C mit PPC1 bzw. PPC2 wurden anhand des Standardredoxpotentials von GSSG/GSH ( $E^{o'} = -299$  mV bei pH 8.0, bzw.  $E^{o'} = -240$  mV bei pH 7.0, Rost & Rapoport, 1964) berechnet. Die pH-Abhängigkeit des Standard-Redoxpotentials ergibt sich dabei aus der Nernstschen Gleichung unter Berücksichtigung der veränderten Konzentration der  $H^+$ -Ionen (vgl. Abschnitt II.12.6). Die kovalenten Komplexe der WW-Domäne mit einem geeigneten prolinreichen Ligand weisen in Bezug auf Glutathion ein negativeres Standard-Redoxpotential auf, das sich auf das "Redoxpaar" reduzierte Spezies/disulfidverbrückter Komplex im Vergleich zum Redoxpaar GSSG/GSH bezieht. Unter Standardbedingungen fungiert Glutathion dementsprechend als Akzeptor (Oxidationsmittel) der Elektronen, die von den reduzierten Spezies WW-SH/PP-SH (Reduktionsmittel) abgegeben werden. Zur ungefähren Einordnung seien an dieser Stelle die Standardredoxpotentiale  $E^{o'}$  (pH 7) für andere Redoxsubstanzen aufgeführt. So ist für DTT ein Wert von -324 mV, für DsbA -122 mV und für Sauerstoff +800 mV beschrieben. DTT stellt demnach das stärkere Reduktionsmittel im Vergleich zu WW-SH/PP-SH dar und wird unter Standardbedingungen eine Komplexbildung stets verhindern. Dagegen sind die periplasmatische Thioldisulfid-Oxidoreduktase DsbA aus *E. coli* sowie Sauerstoff Beispiele starker Oxidationsmittel und stellen demzufolge gute Elektronenakzeptoren in biologischen Systemen dar (Szajewski & Whitesides, 1980; Grauschopf et al., 2003; Sevier & Kaiser, 2002).

Die Differenz der Standardredoxpotentiale  $\Delta E^{o'}$  von verschiedenen Redoxpaaren läßt sich zusätzlich in eine freie Energie  $\Delta G^{o'}$  der entsprechenden Redoxreaktion umrechnen (Abschnitt II.12.6). Im vorliegenden Fall wurde das Standardredoxpotential von freiem Cystin/Cystein herangezogen (-250 mV, Jones et al., 2000), das die Redox-Eigenschaften eines Disulfides in Abwesenheit von stabilisierenden Einflüssen repräsentieren soll. Aus dem negativen Wert von

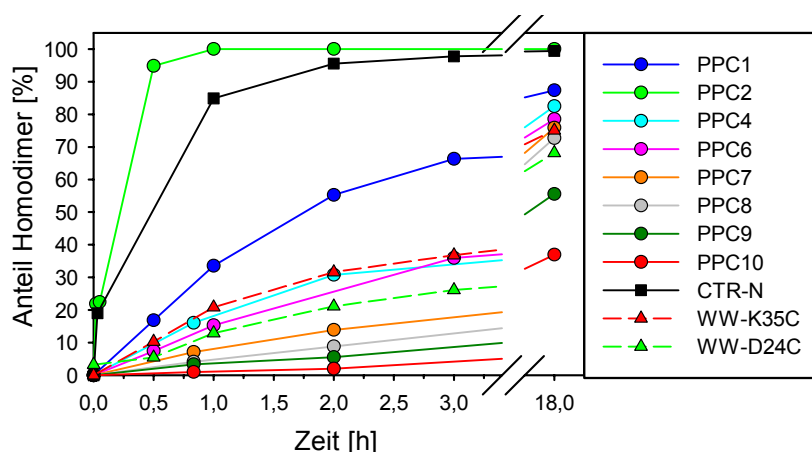
$\Delta G^\circ$  läßt sich ablesen, daß die Disulfidbrücke im Komplex von WW-Domäne und Ligand unter Standardbedingungen um etwa 9.5 bis 12.2 kJ/mol in Bezug zur Disulfidbrücke in Cystin stabilisiert ist (Tabelle 18). Dabei zeigte sich für den Komplex mit dem Liganden PPC1 eine etwas höhere Stabilität im Vergleich zu PPC2 ( $\Delta\Delta G^\circ \sim 2.5$  kJ/mol). Betrachtet man die Aminosäuresequenzen der beiden Liganden ( ), liegt die Schlußfolgerung nahe, daß dem Abstand zwischen Cystein und Polyprolinsequenz im Ligand eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung Disulfidbrücke zur WW-Domäne zukommt. Die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Anwendung der disulfidstabilisierten Interaktion von FBP11-WW1 und Prolinligand als Kopplungssystem werden in Abschnitt IV.2.2 eingehender diskutiert.

#### III.3.4.6. Disulfidverbrückung des Komplexes durch Oxidation in Gegenwart von Luftsauerstoff

Die Ausbildung von Disulfidbrücken wird unter aeroben Bedingungen durch Sauerstoff vermittelt und ist ein spontaner, relativ langsam ablaufender Prozeß, der von zweiwertigen Ionen, insbesondere  $\text{Cu}^{2+}$ , katalysiert wird (Ahmed et al., 1975). Die mechanistischen Details dieser Oxidation sind wenig verstanden. In Abwesenheit von thiolhaltigen Reduktionsmitteln (z.B. DTT, GSH,  $\beta$ -Mercaptoethanol) stellt diese Reaktion einen irreversiblen Prozeß dar. Ist die Oxidation unerwünscht, so läßt sie sich durch Zusatz von chelatisierenden Substanzen (z.B. EDTA) sowie einer Abreicherung des im Puffer gelösten Sauerstoffs weitgehend unterbinden. Obwohl Sauerstoff als ursprüngliches Oxidationsmittel für die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken im Rahmen der Proteinfaltung gilt, sind mit seinem Einsatz experimentelle Schwierigkeiten verbunden, da sich definierte und reproduzierbare Reaktionsbedingungen kaum einstellen lassen (Rudolph et al., 1997). So ist die effektive Sauerstoffkonzentration in wäßrigen Lösungen schwer bestimmbar und variiert maßgeblich mit einer Reihe von anderen experimentellen Gegebenheiten (z.B. Oberflächen/Volumen-Verhältnis, Sauerstoffzufuhr durch Mischung).

Trotz dieser Nachteile war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Interesse, eine Disulfidverbrückung von WW-Domäne und prolinreichem Ligand unter diesen Bedingungen zu realisieren, da somit auf den Einsatz eines Redoxsystems (GSSG/GSH) verzichtet werden könnte. Die im folgenden beschriebenen Kopplungsexperimente lassen sich mangels Einstellung eines Reaktionsgleichgewichts nicht quantitativ interpretieren und sind daher vielmehr als Charakterisierung des Redoxverhaltens der Cystein-Varianten von WW-Domäne und prolinreichem Ligand in Gegenwart von Sauerstoff zu sehen.

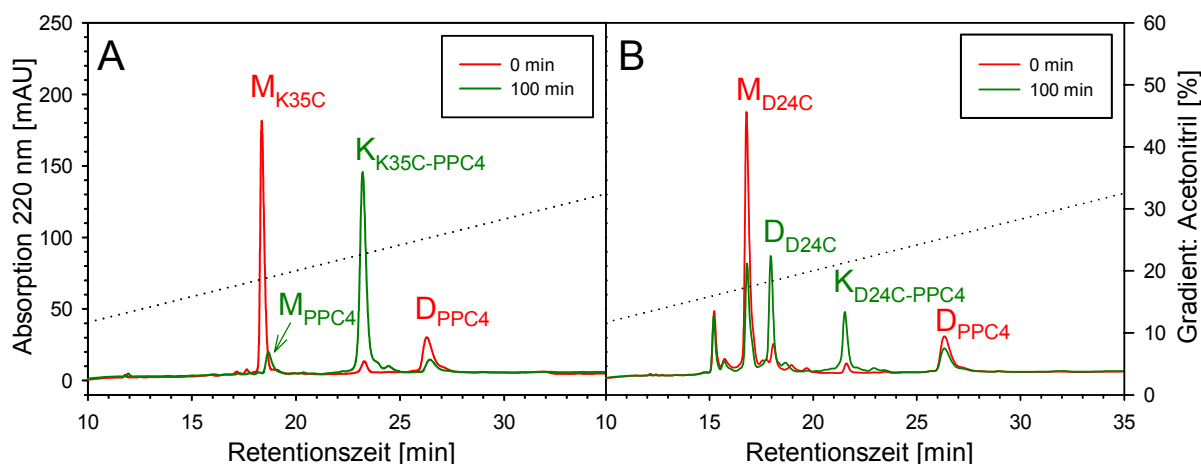
Zunächst stellte sich die Frage, inwiefern die isolierten Komponenten, WW-Domäne und prolinreicher Ligand, in Gegenwart von Sauerstoff Tendenzen zeigen, disulfidverbrückte Homodimere zu bilden. In Gegenwart eines Redoxsystems in hohem molarem Überschuß (4 mM Glutathion) konnte dieses Verhalten für WW-Domäne und Ligand nicht festgestellt werden, da unter oxidierenden Bedingungen stets gemischte Disulfide mit Glutathion populiert wurden (Abschnitt III.3.4.5).



**Abbildung 55:** Oxidative Homodimerisierung der Cystein-Varianten von FBP11-WW1 und prolinreichen Liganden. Analyse: Inkubation von 50  $\mu\text{M}$  WW-Domäne bzw. Ligand in 'WW-Puffer TB' + 1  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  bei 25°C. Die Reaktion wurde durch 1% TFA (v/v) abgestoppt und die vorhandenen Spezies mittels RP-HPLC quantifiziert.

In der Analyse des Oxidationsverhaltens in Gegenwart von Sauerstoff zeigte sich sowohl für die cysteinhaltigen Liganden als auch für die WW-Varianten WW-D24C und WW-K35C eine mit der Zeit fortschreitende Homodimerisierung durch Disulfidverbrückung (Abbildung 55). Diese lag unter den gegebenen Bedingungen für WW-D24C und WW-K35C im Stundenbereich, während die Liganden ein differenzierteres Bild lieferten. So war die Homodimerisierung der Liganden mit N-terminalem Cystein (PPC2 und CTR-N) bereits nach etwa einer Stunde abgeschlossen, während die meisten der übrigen Peptidliganden erst im Bereich von mehreren Stunden signifikant oxidierten. Die unterschiedliche Reaktivität der Peptide beruht dabei vermutlich auf sterischen Parametern, wie der Zugänglichkeit der Cysteine (Jocelyn, 1972).

In den sich anschließenden Versuchen zur oxidativen Kopplung von WW-Domäne und Ligand durch Luftsauerstoff, wurde der Ligand stets im zweifachen molaren Überschuss zu WW-Domäne eingesetzt. Dabei erwies es sich als günstig, bei der Kopplung vom oxidierten Homodimer des Liganden sowie der reduzierten Spezies der WW-Domäne auszugehen, da die kovalente Homodimerisierung der WW-Domäne im Zeitraum der Kopplungsreaktion nur in sehr geringem Ausmaß stattfand. Daß die Reduktion des Ligandenhomodimers durch die reduzierte WW-Domäne tatsächlich zu einer Komplexbildung führte, ist aus Abbildung 56 A ersichtlich. Ausgehend von dem Dimer des Liganden PPC4 sowie der reduzierten WW-Domäne WW-K35C wurde innerhalb von 100 min quantitativ der kovalente Komplex aus beiden Komponenten gebildet. Dabei entsteht infolge des Disulfid-Austauschs für jedes gebildete Komplex-Molekül auch ein reduziertes PPC4-Monomer. Die Entstehung des WW-Homodimers wurde in diesem Fall nicht beobachtet, da diese Reaktion im Vergleich zur Komplexbildung viel langsamer abläuft (vgl. Abbildung 55).



**Abbildung 56:** RP-HPLC-Analyse der kovalenten Komplexbildung mittels Oxidation durch Luftsauerstoff in Gegenwart von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen. Vergleich der Kopplungen von 100  $\mu\text{M}$  PPC4 mit **(A)** 50  $\mu\text{M}$  WW-K35C und **(B)** 50  $\mu\text{M}$  WW-D24C in 'WW-Puffer TB' + 1  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  bei 25°C (Auftrag: 10  $\mu\text{l}$  des Ansatzes, entspricht: 2  $\mu\text{g}$  WW-Domäne/10  $\mu\text{g}$  Ligand). Die Zuordnung der auftretenden Spezies erfolgte anhand ihrer zuvor bestimmten Retentionszeiten (vgl. Tabelle 24 im Anhang). Identifiziert wurden jeweils: monomere Spezies (M), Homodimere (D) sowie Komplex (K). Die genaue Zuordnung ist aus den Indizes ersichtlich.

Interessanterweise verlief die analoge Komplexbildung von WW-D24C mit dem Liganden PPC4 unter signifikanter Population des oxidierten WW-D24C-Homodimers und dementsprechend verminderter Ausbildung des WW-D24C-PPC4-Komplexes (Abbildung 56 B). Die Homodimerisierung von WW-D24C wurde unter diesen Bedingungen offensichtlich stark begünstigt und stellte somit die dominante Reaktion dar. Dieses unterschiedliche Verhalten von WW-D24C und WW-K35C war zuvor nicht anhand ihrer Homodimerisierungsgeschwindigkeiten bei der Oxidation durch Luftsauerstoff zu erkennen, da diese Reaktionen deutlich langsamer abliefen. In Tabelle 19 sind die beobachteten Ausbeuten der Kopplungen von WW-D24C und WW-K35C mit den verschiedenen Liganden, unter Berücksichtigung ggf. entstandener WW-Homodimere, zusammengefasst.

**Tabelle 19:** Ausbeuten der Kopplung durch spontane Oxidation vermittelt durch Luftsauerstoff, für WW-K35C und WW-D24C mit verschiedenen Liganden (50  $\mu\text{M}$  WW-Domäne, 100  $\mu\text{M}$  Ligand, 'WW-Puffer TB' + 1  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ , 25°C, 20 h). Die Angaben beziehen sich auf die Konzentration der eingesetzten WW-Domäne.

Ligand	Aminosäure-Sequenz	WW-K35C		WW-D24C	
		Kompl. <sup>1</sup>	Dimer <sup>2</sup>	Kompl. <sup>1</sup>	Dimer <sup>2</sup>
PPC1	S GCG SGS GSP PPP PPL P	100 %	-	- <sup>3</sup>	- <sup>3</sup>
PPC2	CSG PPP PPP PPL P	100 %	-	28 %	72 %
PPC4	GCP PPP PPL P	100 %	-	32 %	68 %
PPC6	GPP CPP PPL P	97 %	3 %	65 %	35 %
PPC7	GGP PPC PPL P	98 %	2 %	96 %	4 %
PPC8	GGP PPP PCL P	95 %	5 %	80 %	20 %
PPC9	GGP PPP PPL C	97 %	3 %	79 %	21 %
PPC10	GPP PPL PPG C	100 %	-	95 %	5 %

<sup>1</sup> disulfidverbrückter Komplex zwischen WW-Variante und jeweiligem Liganden

<sup>2</sup> disulfidverbrücktes Homodimer der WW-Domäne

<sup>3</sup> nicht analysiert

WW-K35C zeigte mit sämtlichen Liganden einen nahezu quantitativen Umsatz zum WW-Ligand-Komplex, infolgedessen wurde kaum Homodimer von WW-K35C beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte im Fall von WW-D24C nur mit zwei Liganden (PPC7, PP10) ein nahezu vollständiger Umsatz zum Komplex festgestellt werden. Die Disulfidverbrückung mit den übrigen Liganden führte parallel stets zu signifikanter Homodimerisierung der WW-Domäne. Wie sich bereits in den Kopplungsanalysen unter Redoxbedingungen gezeigt hatte (Abschnitt III.3.4.3), schien die Position des Cysteins in WW-D24C eher ungeeignet für die kovalente Kopplung des Liganden zu sein. Möglicherweise ist die kovalente Kopplung an dieser Stelle (Loop 1) durch die überwiegende Zahl der Liganden mit einem Strukturverlust der WW-Domäne verbunden, der zu einer Destabilisierung des gebildeten Komplexes führt und demzufolge die alternative Kopplungsreaktion (Homodimerisierung) begünstigt (siehe Abschnitt IV.2.2).

Wie beschrieben, war die Sauerstoff-unabhängige Kopplung ausgehend vom oxidierten Homodimer des Liganden mit der reduzierten WW-Domäne im Rahmen einer Thiol-Disulfid-Austauschreaktion möglich. Im Gegensatz dazu, wurde der umgekehrte Fall nicht beobachtet (Abbildung 57), bei dem das oxidierte Homodimer der WW-Domäne mit Hilfe des reduzierten Liganden in den Komplex überführt wird (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise geht die Homodimerisierung der WW-Domäne gleichzeitig mit einer Strukturänderung (z.B. Entfaltung) einher, infolgedessen die Cysteine für eine Reduktion durch den Liganden nicht mehr zugänglich sind.



**Abbildung 57:** Reaktionen, die im Rahmen der O<sub>2</sub>-vermittelten, oxidativen Kopplung von WW-Domäne (WW) und prolinreichem Ligand (PP) beobachtet wurden. Dabei stellen lediglich die Reaktionen 1-3 Oxidationen durch Sauerstoff dar. In Reaktion 4 wird zur Bildung des Komplexes das Homodimer des Liganden reduziert (Thiol-Disulfid-Austausch). Reaktion 5 wurde nicht beobachtet.

Im Gegensatz zur Komplexbildung unter Einsatz eines Redoxsystems (GSSG/GSH), bei der es zu einer Gleichgewichtseinstellung kommt, ermöglicht die oxidative Disulfidbrückenbildung vermittelt durch Luftsauerstoff unter geeigneten Bedingungen eine quantitative Kopplung der beteiligten Komponenten.

### III.3.4.7. <sup>1</sup>H-NMR-Analyse ausgewählter kovalenter Komplexe von WW-Domäne und Ligand

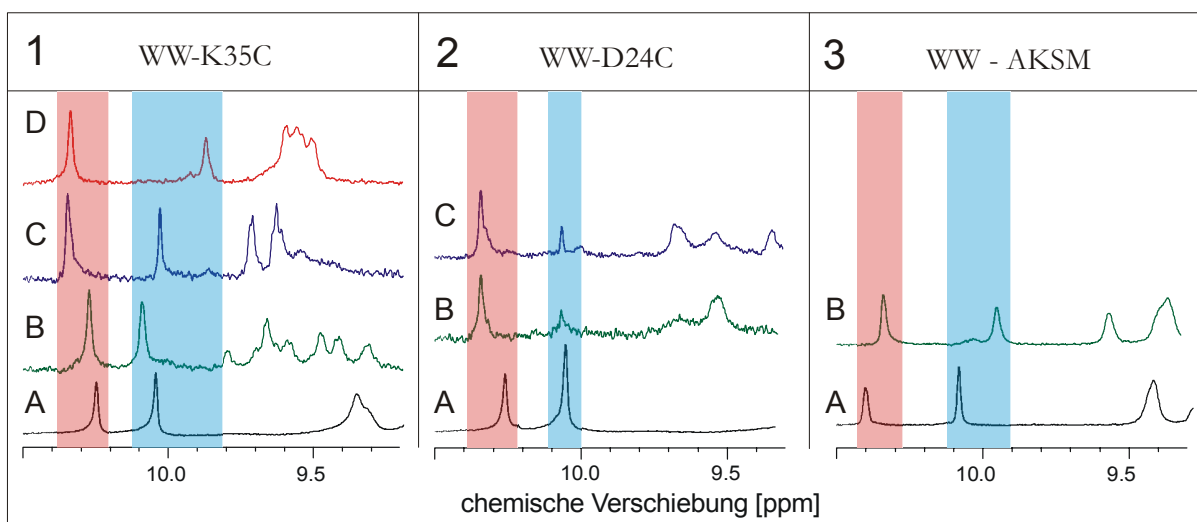
Wie in Abschnitt III.3.2.2 beschrieben, ließ sich aus den eindimensionalen <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von WW-D24C und WW-K35C im Vergleich mit der Wildtyp-WW-Domäne schließen, daß beide Cysteinvarianten im isolierten Zustand die charakteristische WW-Faltung aufweisen. Kriterien waren, neben der generellen Signaldispersion, die chemischen Verschiebungen der indolischen NH-Signale der Tryptophan-Seitenketten von W17 und W39 im Tieffeldbereich der NMR-Spektren (~ 10 ppm). Für den Wildtyp WW-AKSM zeigte sich, daß die (nicht-kovalente) Bindung des Liganden PPN4 mit einer leichten Hochfeldverschiebung beider N<sub>H</sub>-Signale einhergeht, die strukturelle Veränderungen in den Umgebungen von W17 und W39 symbolisieren, die offensichtlich durch die Bindung des Liganden bedingt sind (Abbildung 58-3).



Ähnliche Untersuchungen wurden für WW-D24C und WW-K35C anhand ihrer disulfidverbrückten Komplexe mit ausgewählten prolinreichen Liganden durchgeführt, um beurteilen zu können, ob die kovalente Kopplung des Liganden sich in vergleichbaren Strukturänderungen oder ggf. Strukturverlust der WW-Domäne äußerten. Dazu wurden die jeweiligen kovalenten Komplexe durch Oxidation in Gegenwart von Luftsauerstoff hergestellt (Abschnitt III.3.4.6), wobei der quantitative Umsatz der WW-Domäne anhand von RP-HPLC-Analysen verifiziert wurde. Der überschüssige Ligand wurde durch Dialyse mit Hilfe einer Membran geeigneter Porengröße (Ausschluß von Molekülen < 1 kDa) entfernt.

Die Auswahl der Liganden erfolgte anhand ihrer beobachteten Eigenschaft, bei der Disulfidverbrückung in Gegenwart von Sauerstoff möglichst quantitativ den Komplex mit der WW-Domäne einzugehen ohne signifikante Akkumulation des Homodimers der WW-Domäne. Das war für WW-K35C bei den Liganden PPC2, PPC4 und PPC10 der Fall und für WW-D24C anhand der Liganden PPC7 und PPC10 gegeben. Der Ligand PPC1 erfüllte diese Bedingungen zwar auch, konnte aber mangels Verfügbarkeit ausreichender Mengen an dieser Stelle nicht analysiert werden.

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren zeigten für alle untersuchten Komplexe der beiden WW-Varianten eine generelle Signaldispersion, die auf eine Ausbildung von geordneten Strukturen hinwies. (Abschnitt III.1.3.3). Außerdem unterschieden sich die Spektren der Komplexe von dem der zugehörigen freien WW-Domäne in der Verschiebung zahlreicher Signale über den gesamten Bereich des Spektrums. Mangels Zuordnung konnten diese zwar nicht individuell interpretiert werden, sie sprachen aber für globale Strukturänderungen innerhalb der WW-Domäne infolge der kovalenten Kopplung des Liganden (Daten nicht gezeigt). Diese Veränderungen zeigten sich auch an den charakteristischen Seitenketten-NH-Signalen von W17 und W39, die im Rahmen der Untersuchung näher betrachtet wurden (Abbildung 58 -1 und -2).



**Abbildung 58:** Ausschnitte aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der WW-Domäne im kovalenten/nicht-kovalenten Komplex mit prolinreichen Liganden. **(1)** Vergleich von WW-K35C ohne Ligand (A) sowie in Form des kovalenten Komplexes mit PPC10 (B), PPC4 (C) und PPC2 (D). **(2)** Vergleich von WW-D24C ohne Ligand (A) sowie im kovalenten Komplex mit PPC7 (B) und PPC10 (C). **(3)** Vergleich von WW-AKSM (A) ohne Ligand und (B) unter nicht-kovalenter Bindung von PPN4 (2-facher molarer Überschuß). Die Aufnahme der Spektren erfolgte in 'WW-Puffer P-NMR' bei  $25^\circ\text{C}$  mit Proteinkonzentrationen von  $400\ \mu\text{M}$  (kovalente Komplexe) bzw.  $1\ \text{mM}$  (nicht-kovalenter Komplex und freie WW-Domänen). Die typischen  $\text{N}_\text{H}$ -Signale sind für W17 (rot) und W39 (blau) markiert.

Im Fall des WW-K35C zeigten die Signale von W17 und W39 des Komplexes mit PPC10 nur sehr geringe Verschiebungen, wobei diese für W39 größer war als für W17. Offensichtlich beeinflusst der kovalent gekoppelte Ligand mit C-terminalem Cystein die Umgebung der beiden

Tryptophane nur sehr wenig. Es wird vermutet, daß er sich im gekoppelten Zustand nicht direkt an der Ligandenbindungsstelle der WW-Domäne befindet. Ein ähnliches Bild zeigte sich für den Komplex von WW-K35C mit PPC4, mit dem Unterschied, daß das Signal von W17 weiter in Richtung Tieffeld verschoben ist. W39 weist jedoch darauf hin, daß der Ligand auch hier nicht in direkter Nähe der Bindungsstelle positioniert zu sein scheint. Die deutlichste Verschiebung der beiden indolischen NH-Signale von WW-K35C zeigte sich im Fall des Komplexes mit PPC2, unter der Annahme daß die Zuordnung des W39-N<sub>ε</sub>H-Signals (9.85 ppm) korrekt ist. Letzteres weist eine deutliche Hochfeldverschiebung im Vergleich zur freien WW-Domäne auf, wie sie auch bei der (nicht-kovalenten) Bindung von WW-AKSM an PPN4 beobachtet wurde (Abbildung 58 - 3). Es kann daher vermutet werden, daß der gekoppelte Ligand in diesem Komplex tatsächlich in der Ligandenbindungsstelle der WW-Domäne gebunden vorliegt, in der W39 eine zentrale Rolle spielt. Die chemische Verschiebung des W17-Signals in Richtung Tieffeld war dagegen weniger aufschlußreich im Vergleich zur nicht-kovalenten Ligandenbindung (Hochfeldverschiebung). Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß sich WW-AKSM und WW-K35C (abgeleitet von WW-wt) in der unmittelbaren Sequenzumgebung von W17 anhand der vier Aminosäuren AKSM in WW-AKSM unterscheiden, was sich ebenfalls in unterschiedlichen chemischen Verschiebungen dieses Signals äußerte (Abschnitt III.1.3.3).

In den Analysen der kovalenten Komplexe von PPC10 bzw. PPC7 mit WW-D24C wurde übereinstimmend eine deutliche Intensitätsabnahme des W39-Signals beobachtet, während die chemische Verschiebung des verbliebenen Signals jedoch unverändert blieb. Im Vergleich dazu blieb die Intensität des W17-Signals, unter leichter Tieffeldverschiebung, jedoch gleich. Das Verschwinden des W39-Signals kann mit Austauschphänomenen bzw. veränderten Relaxationseigenschaften des indolischen Protons in Verbindung gebracht werden, die ggf. einer veränderten konformationellen Flexibilität der näheren Umgebung von W39 (z.B. Loop 1) geschuldet sind. Da sich die in Loop 1 (Cystein C24) kovalent verknüpften Liganden in räumlicher Nähe zu W39 befinden, liegt die Vermutung nahe, daß sich die damit verbundenen strukturellen Veränderungen auch im W39-Signal widerspiegeln. Wird mehr als eine Konformation innerhalb der Struktur populiert, so bestimmt die Geschwindigkeit der konformationellen Umwandlungen (Austausche) in Bezug zur Zeitskala eines NMR-Experimentes ( $\mu$ s bis ms) das Verhalten des beobachteten NMR-Signals. Finden diese deutlich schneller statt, so ergibt sich ein einzelnes mittleres Signal für W39. Sind die Austausche dagegen deutlich langsamer als die NMR-Zeitskala, so würde das zu einer Aufspaltung in mehrere Signale führen, deren Intensitäten mit der Population jeder Konformation korrelieren. Zwischen hohen und niedrigen Austauschgeschwindigkeiten kann es allerdings auch zu einer intermediären Situation kommen, in der das Signal ggf. überhaupt nicht zu beobachten ist (Cavanagh et al., 1996). Im Fall der Komplexe von WW-D24C mit PPC7 und PPC10 scheint die kovalente "Quervernetzung" mit den Peptidliganden eine Verringerung der konformationellen Flexibilität von Loop 1 zu bewirken, womit die deutliche Abnahme des W39-Signals erklärt werden könnte. Da sich die chemische Verschiebung des verbliebenen W39-Signals der Komplexe nicht von dem der freien Domäne unterschied, wurde weiterhin angenommen, daß die kovalent gekoppelten Liganden nicht in der eigentlichen Bindungstasche, d.h. gebunden, vorliegen.

### III.3.5. Kovalente Assoziation von GST-WW und PP-GFP

In den bisherigen Abschnitten wurden Bindungseigenschaften und Kopplungsverhalten der isolierten WW-Domäne zu prolinreichen Peptidliganden betrachtet. Diese Untersuchungen stellten die Basis der Etablierung eines Verfahrens zur stabilen kovalenten Assoziation von Proteinen dar, da an ihnen die zugrundeliegenden Prinzipien und Erfordernisse einer derartigen Kopplung erörtert werden konnten. Im Zentrum der folgenden Abschnitte stehen dagegen



Ergebnisse von Experimenten, in denen die Übertragbarkeit des Verfahrens auf die Proteinebene analysiert werden sollte. Anhand von rekombinant hergestellten Fusionen der WW-Domäne sowie des prolinreichen Liganden mit geeigneten Modellproteinen, sollte eine gerichtete kovalente Assoziation von zwei Proteinen gezeigt werden, die *per se* keine Affinität zueinander aufweisen.

Zu diesem Zweck wurde einerseits die bereits vorhandene Fusion von Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* und WW-Domäne verwendet, in deren Form bereits sämtliche Varianten der isolierten FBP11-WW1-Domäne hergestellt worden waren (Abschnitt II.9.6). Andererseits wurden verschiedene Fusionen des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus *Aequoria victoria* mit einer prolinreichen Sequenz generiert, das aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften den Nachweis des kovalenten Kopplungsproduktes beider Proteine vereinfachen sollte.

#### III.3.5.1. Herstellung der GST- und GFP-Fusionsproteine

Da in den vorangegangenen Untersuchungen für die Variante WW-D24C keine präferentielle Bildung eines kovalenten Komplexes mit dem Liganden nachgewiesen werden konnte, wurde im Folgenden ausschließlich mit der Variante WW-K35C gearbeitet. Die Expression und Reinigung von GST-WW-K35C erfolgte in Analogie zu der bereits beschriebenen Reinigung von GST-Fusionen der WW-Domäne (Abschnitt III.1.2.1). Erwartungsgemäß wurden dabei ähnliche Expressionsausbeuten verglichen mit den cysteinfreien Varianten erzielt. Nach der Affinitätsreinigung wurde das gereinigte Protein einer Dialyse gegen 'WW-Puffer TA' unterzogen, um das zur Elution eingesetzte Glutathion zu entfernen. GST-WW-K35C ließ sich anschließend bis zu einer Konzentration von 1.5 mM aufkonzentrieren. Die Analyse im Coomassie-gefärbten SDS-Gel ergab eine Reinheit von > 95 % (Daten nicht gezeigt), die Molekularmasse wurde mittels Massenspektrometrie überprüft (Tabelle 21 im Anhang).

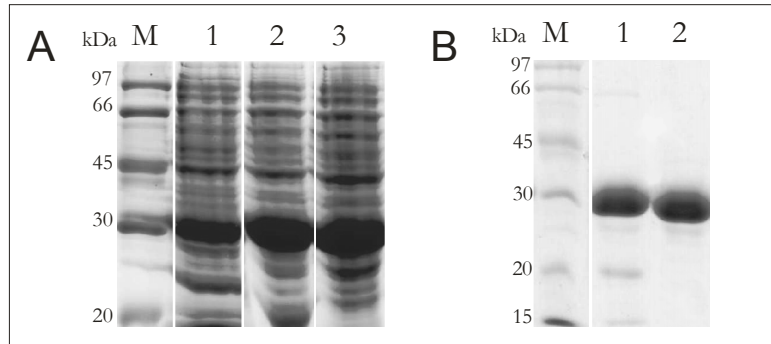
Die Herstellung der Fusion von GFP mit der prolinreichen Sequenz P<sub>8</sub>LPP erfolgte ebenfalls rekombinant in *E.coli*. Die prolinreiche Sequenz war dabei vom Peptidliganden PPC3 abgeleitet worden, der sich zum Zeitpunkt der Planung des Konstruktes als aussichtsreichster Kandidat erschien. Im Nachhinein wäre die Wahl zwar auf PPC1 gefallen, jedoch ergab sich die Eignung dieses Liganden, der einen größeren Abstand zwischen Cystein und prolinreicher Sequenz aufweist, erst zu einem späteren Zeitpunkt.

Insgesamt wurden vier Konstrukte geplant, zwei in N-terminaler und zwei weitere in C-terminaler Fusion der Prolinsequenz zum GFP. Diese Konstrukte wurden dabei jeweils mit einem Cystein versehen, N- bzw. C-terminal bezüglich der prolinreichen Sequenz (Abbildung 10, Abschnitt II.9.6). Allerdings konnten nur drei der vier Varianten zur Expression gebracht werden, da die Klonierung des vierten Konstruktes nicht erfolgreich verlief (Daten nicht gezeigt). Die Expression der N-terminalen Fusion C-PP-GFP sowie der beiden C-terminalen Fusionen GFP-C-PP und GFP-PP-C (Abschnitt II.10.1) war im löslichen Überstand des Zellextraktes von *E.coli* in Form einer dominanten Bande gut zu erkennen (Abbildung 59 A). Dabei zeigte sich für die Varianten mit C-terminalem Polyprolin-*tag* eine etwas höhere Expressionsausbeute als für das Protein mit N-terminaler Fusion. Möglicherweise ist dieser Unterschied auf RNA-Sekundärstrukturen zurückzuführen, die sich aufgrund repetitiver, GC-reicher Sequenzabschnitte ausbilden können und ggf. die Initiation der Translation hemmen (Looman et al., 1986). Diese Problematik ergibt sich zwangsläufig für Polyprolinsequenzen, die durch die Codons CCA, CCG, CCC und CCU kodiert werden.

Für GFP ohne Polyprolin-*tag* wurde ein ähnliches Expressionsniveau in einem verwandten T7-Expressionssystem beschrieben (Pultke, 2003). Obwohl die Expression von Proteinen mit repetitiven Aminosäuresequenzen prinzipiell durch die Verfügbarkeit der entsprechenden tRNAs

und Aminosäuren limitiert sein kann (Ramirez & Bentley, 1999), wurde die *per se* sehr gute rekombinante Expression von GFP durch die fusionierte Polyprolinsequenz offensichtlich nicht signifikant herabgesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Variante C-PP-GFP bis zur Homogenität gereinigt und anhand von Kopplungsstudien mit GST-WW-K35C näher analysiert.

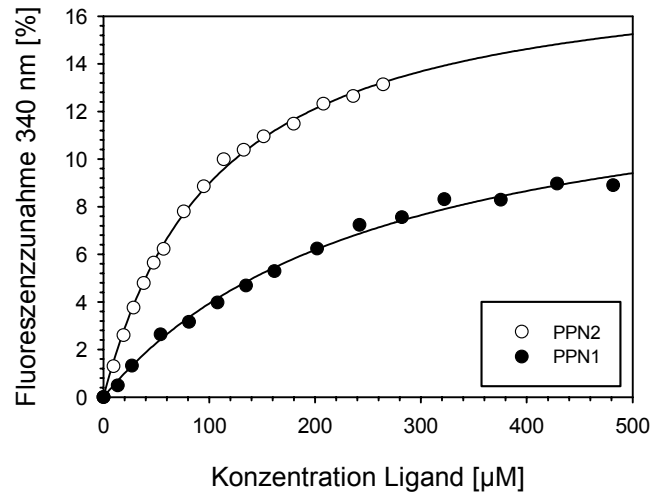


**Abbildung 59:** Expression und Reinigung von N- bzw. C-terminalen Varianten der Polyprolin-GFP-Fusion **(A)** Auftrennung des löslichen Überstands der rekombinanten Expression durch SDS-PAGE von C-PP-GFP (Spur 1), GFP-C-PP (Spur 2) und GFP-PP-C (Spur 3). Sequenzdetails der Konstrukte sind aus Abbildung 10 (Abschnitt II.9.6) ersichtlich. **(B)** Reinigung von C-PP-GFP durch IMAC und Gelfiltration: SDS-PAGE-Analyse einer Fraktion nach Elution von der NiNTA-Säule (Spur 1), gereinigte Fraktion von C-PP-GFP nach der proteolytischen Abspaltung des N-terminalen Hexahistidin-*tags* und anschließender Gelfiltration (Spur 2).

Die Reinigung von C-PP-GFP erfolgte anhand des N-terminalen His<sub>6</sub>-*tags*, der durch den verwendeten Expressionsvektor zur Verfügung gestellt wurde. Der erste Reinigungsschritt erfolgte durch immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC, Abschnitt II.10.5) und zeigte bereits einen signifikanten Reinigungseffekt (Abbildung 59 B). Der N-terminale His<sub>6</sub>-*tag* konnte nachfolgend (in Gegenwart des Elutionsmittels Imidazol) durch proteolytische Spaltung mittels Thrombin entfernt werden. Die Proteolysebedingungen (2 U/ml Thrombin, 16 h, 37°C) wurden analog den Bedingungen der Spaltung von GST-WW gewählt (Abschnitt III.1.2.2). Dabei wurde kein unspezifischer Abbau von C-PP-GFP beobachtet. Nach einem letzten Reinigungsschritt anhand einer präparativen Gelfiltration (Abschnitt II.10.8) ließ sich das Protein auf eine Konzentration von 1.2 mM in 'WW-Puffer TA' konzentrieren. Die Homogenität des Proteins wurde anhand eines Coomassie-gefärbten SDS-Gels auf >95% geschätzt (Abbildung 59 B) und die Identität durch Massenspektrometrie verifiziert (Tabelle 21 im Anhang).

### III.3.5.2. Bindungseigenschaften von GST-WW-K35C

Im Rahmen der Etablierung des Verfahrens zur Assoziation von Proteinen, die durch die Affinität der WW-Domäne zu prolinreichen Liganden vermittelt wird, sollte der Einfluß des Fusionspartners GST auf das Bindungsverhalten der WW-Domäne untersucht werden. Anhand von Fluoreszenztitrationsanalysen wurden die Dissoziationskonstanten der Bindung von GST-WW-K35C zu cysteinfreien, prolinreichen Peptidliganden (PPN1, PPN2) untersucht (Abschnitt II.12.2). GST-WW verfügt über insgesamt 6 Tryptophan-Reste (4 in GST, 2 in der WW-Domäne), deren Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweils zugesetzten Liganden verfolgt wurde. Dabei wurde für beide Liganden eine Intensitätszunahme der Fluoreszenz beobachtet, die für PPN2 stärker war als für PPN1 und ein Sättigungsverhalten zeigte (Abbildung 60).



**Abbildung 60:** Analyse der Bindung von prolinreichen Liganden (PPN1, PPN2) an 8 µM GST-WW-K35C bei 25°C in 'WW-Puffer TA'. Die Anpassung der Daten erfolgte anhand eines 1:1 Bindungsmodells.

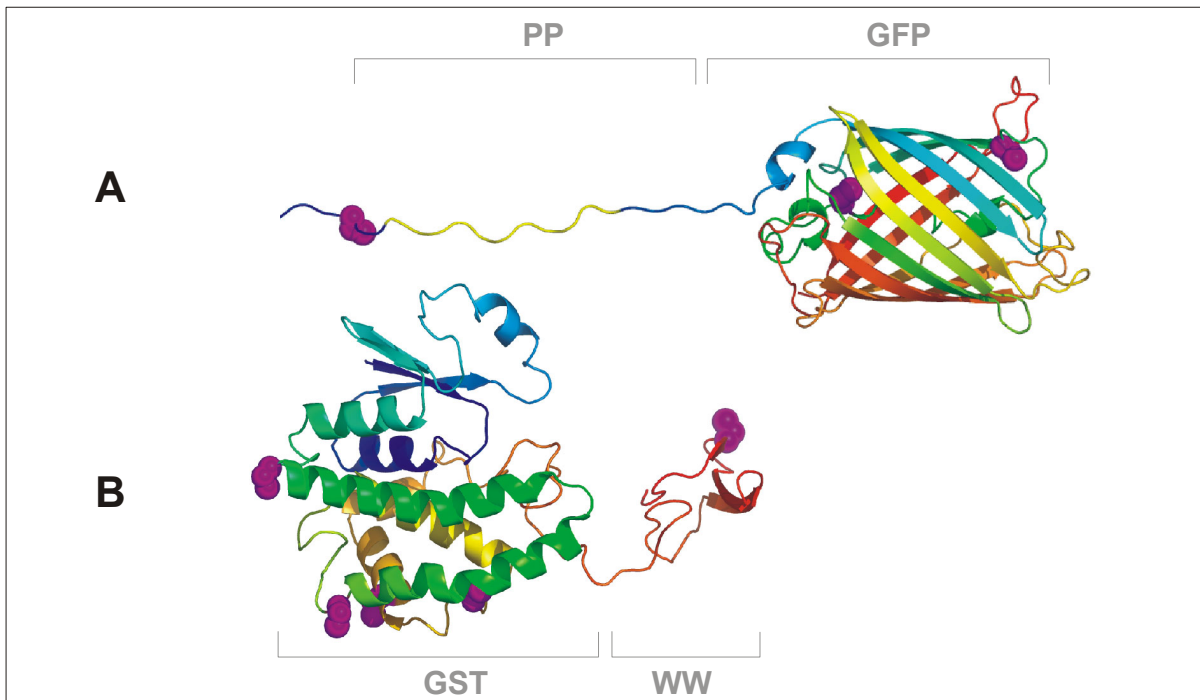
Die mathematische Anpassung an eine 1:1 Bindung lieferte Dissoziationskonstanten für PPN1 mit  $K_D = 258 \pm 32 \mu\text{M}$  und für PPN2 mit  $K_D = 100 \pm 6 \mu\text{M}$ . Die höhere Affinität zu PPN2 wurde auch in Bindungsstudien an der isolierten WW-Domäne beobachtet und ist sehr wahrscheinlich auch hier auf die Anwesenheit des zusätzlichen, C-terminalen Prolin-Restes in PPN2 zurückzuführen (vgl. Abschnitt III.1.5.2). Daneben zeigte sich eine etwas höhere Affinität von GST-WW-K35C zu PPN2 im Vergleich zur Bindung der isolierten WW-Domäne WW-K35C an diesen Liganden ( $185 \pm 5 \mu\text{M}$ , Abschnitt III.3.2.2). Möglicherweise wirkt sich die "Fixierung" des N-Terminus WW-K35C infolge der Anwesenheit des Fusionspartners GST auf die Bindungseigenschaften aus, die auf diese Weise stabilisiert werden könnte. Eine unspezifische Bindung des Liganden an GST ist dagegen eher unwahrscheinlich, da die Erkennung und Bindung von Polyprolinliganden bekanntermaßen sehr spezifisch erfolgt und an definierte strukturelle Kriterien gebunden ist, die offensichtlich nur von "spezialisierten" Bindemodulen (z.B. SH3- und WW-Domänen) erfüllt werden (Nguyen et al., 1998). Daneben ergibt sich aus der Affinität des Peptidliganden PPN1 zu GST-WW-K35C, im Rahmen der experimentellen Genauigkeit der Messungen, eine recht gute Übereinstimmung mit dem  $K_D$ -Wert seiner Bindung an WW-AKSM ( $K_D = 226 \pm 6 \mu\text{M}$ ). Prinzipiell kann daher festgehalten werden, daß der Fusionspartner GST die Bindungseigenschaften der WW-Domäne nicht signifikant zu beeinflussen scheint.

### III.3.5.3. Nachweis der kovalenten Assoziation von GST und GFP

Die Analytik der Kopplung von GST-WW-K35C und C-PP-GFP durch Bildung einer intermolekularen Disulfidbrücke konnte anhand einer kombinierten Methode basierend auf analytischer Gelfiltration und SDS-PAGE durchgeführt werden. Aus beiden Verfahren lassen sich Aussagen zur Molekularmasse der entstandenen Kopplungsprodukte treffen. Die Gelfiltration erlaubte sowohl eine Analyse der Wechselwirkung unter nativen Bedingungen als auch eine präparative Isolierung ausgewählter Kopplungsprodukte. Anhand der SDS-PAGE erfolgte eine Differenzierung zwischen kovalent und nicht-kovalent assoziierten Spezies.

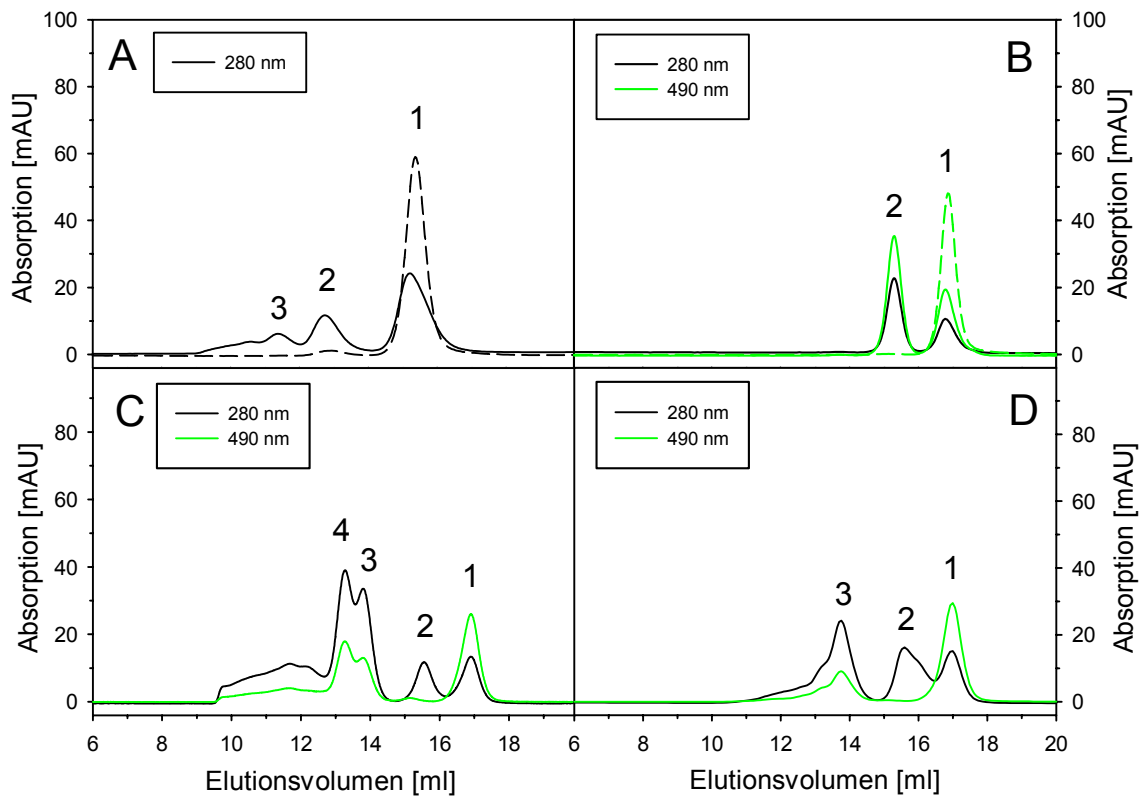
Ein wesentlicher Aspekt dabei war, daß die Fusionspartner GST und GFP zusätzliche, freie Cysteine aufweisen, die ggf. in eine unspezifische Kopplung involviert sein können. GST enthält dabei vier (GST-WW-K35C dementsprechend 5) und GFP 2 Cysteine (C-PP-GFP entsprechend 3), von denen keine intramolekular disulfidverbrückt vorliegen (Lim et al., 1994a; Ormo et al., 1996). Anhand von Modellstrukturen beider Proteine wurde versucht, die Zugänglichkeit der Cysteine abzuschätzen (Abbildung 61). Die beiden Cysteine von GFP erwiesen sich dabei dem

Lösungsmittel unzugänglich, während im Fall von GST mindestens drei der vier Cysteine als oberflächenexponiert anzusehen sind.



**Abbildung 61:** Modellstrukturen von C-PP-GFP (**A**) und GST-WW-K35C (**B**). Die Cysteine sind violett markiert, der Verlauf der Polypeptidketten ist farblich vom N-Terminus (blau) bis zum C-Terminus (rot) gekennzeichnet. Die Modellierung von C-PP-GFP basierte auf der Kristallstruktur von GFP (PDB-Code: 1EMA) sowie einem Modell der prolinreichen Sequenz P<sub>8</sub>LPP unter Annahme der Polyprolin-II-Helix-Konformation. Das Modell von GST-WW-K35C beruht auf der Kristallstruktur von GST (PDB-Code: 1GNE) sowie der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten NMR-Struktur von FBP11-WW1 in Abwesenheit eines Liganden (Abschnitt III.2.3).



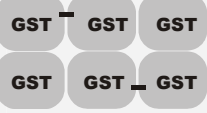




Die Untersuchung der Assoziation erfolgte zunächst durch analytische Gelfiltration (Abschnitt II.10.8). Die parallele Detektion der Absorption bei 280 nm und 490 nm erleichterte die Zuordnung der dabei auftretenden Peaks erheblich. Die Zuordnung ist aus Tabelle 20 ersichtlich. Obwohl die Molekularmassen der Monomere von GST-WW und PP-GFP sehr ähnlich waren (~30 kDa), ließen sich beide Proteine in der Gelfiltration gut unterscheiden, da GST unter nativen Bedingungen als (nicht-kovalentes) Homodimer vorliegt (McTigue et al., 1995). So verhielt sich auch GST-WW, wobei durch Oxidation außerdem disulfidverbrückte Homotetramere und höhermolekulare Oligomerisierungszustände akkumuliert wurden (Abbildung 62 A). Das Laufverhalten von PP-GFP wies dagegen auf die Existenz des Monomers unter reduzierenden Bedingungen hin, das in Gegenwart von Luftsauerstoff langsam zum disulfidverbrückten Homodimer oxidierte (Abbildung 62 B). In diesem Fall ist davon auszugehen, daß die Dimerisierung über das eingeführte Cystein der Polyprolinsequenz erfolgte, da keine höhermolekularen Assoziate als das Dimer von PP-GFP detektiert werden konnten. Diese könnten ausschließlich durch Verbrückung der übrigen Cysteine von GFP entstehen. Im Fall von GST-WW dagegen ließ sich an dieser Stelle nicht beurteilen, ob die Disulfidverbrückung ggf. auch über die Cysteine von GST erfolgt war. Aufgrund des dimeren Charakters von GST führt jede Assoziation ununterscheidbar zu Vielfachen des Dimers.



**Abbildung 62:** Gelfiltrationsanalyse von GST-WW-K35C und C-PP-GFP sowie ihrer durch Disulfidverbrückung entstandenen Homo- bzw. Hetero-Oligomere. Die Detektion erfolgte anhand der Absorption bei 280 nm (schwarze Linien) bzw. 490 nm (grüne Linien). Es wurden jeweils 40 µl der Probe aufgetragen. **(A)** 50 µM GST-WW-K35C nach 16 h Oxidation (Luftsauerstoff, 'WW-Puffer TB' + 1 µM CuCl<sub>2</sub>, durchgezogene Linien) und in Gegenwart von 5 mM DTT (gestrichelte Linie). **(B)** 50 µM C-PP-GFP nach 16 h Oxidation (Luftsauerstoff, 'WW-Puffer TB' + 1 µM CuCl<sub>2</sub>, durchgezogene Linien) und nach Reduktion mit 5 mM DTT (gestrichelte Linie, nur für A490 gezeigt). **(C)** Kovalente Kopplung von 50 µM GST-WW-K35C und C-PP-GFP durch Oxidation mittels Luftsauerstoff in 'WW-Puffer TB' + 1 µM CuCl<sub>2</sub> (25°C, 3h) **(D)** Kovalente Kopplung von 30 µM GST-WW-K35C und C-PP-GFP in Anwesenheit eines Redoxsystems basierend auf 4 mM Glutathion (3.4 mM GSSG, 0.6 mM GSH in 'WW-Puffer TB' + 1 mM EDTA, 25°C, 75 min)

Die kovalente Assoziation von GST-WW-K35C und C-PP-GFP erfolgte analog zur Kopplung der freien WW-Domäne an einen prolinreichen Peptidliganden. Dabei wurde die Ausbildung der Disulfidbrücke entweder durch Oxidation in Gegenwart von Luftsauerstoff (vgl. Abschnitt III.3.4.6) oder durch die Verwendung eines Redoxsystems basierend auf oxidiertem und reduziertem Glutathion (vgl. Abschnitt III.3.4.3) vermittelt. Im Fall der Oxidation durch Luftsauerstoff konnten anhand der analytischen Gelfiltration mehrere höhermolekulare Spezies beobachtet werden, die hauptsächlich in Form von zwei dominanten Peaks eluierten und deren Größenordnung etwa im Bereich des GST-WW-Homotetramers (120 kDa) lag (Abbildung 62 C).

**Tabelle 20:** Zuordnung der beobachteten homo- bzw. heterooligomeren Spezies der oxidativen Kopplung von C-PP-GFP und GST-WW-K35C. Für GST-WW treten sowohl kovalente als auch nicht-kovalente Oligomerzustände auf. Die angegebene Peaknummer korrespondiert mit der Numerierung in Abbildung 62.

Proteinspezies	Oligomerisierungszustand	Schema	Molekulargewicht <sup>1</sup>	Peaknummer <sup>2</sup>
[GST-WW] <sub>2</sub>	nicht-kovalentes Homodimer		61 kDa	A1, C2, D2
[GST-WW] <sub>4</sub>	kovalentes Homotetramer		122 kDa	A2
[GST-WW] <sub>6</sub>	kovalentes Homohehexamer		183 kDa	A3
PP-GFP	Monomer		29 kDa	B1, C1, D1
[PP-GFP] <sub>2</sub>	kovalentes Homodimer		58 kDa	B2
[GST-WW] <sub>2</sub> -PP-GFP	kovalentes Heterotrimer		90 kDa	C3, D3
[GST-WW] <sub>2</sub> -[PP-GFP] <sub>2</sub>	kovalentes Heterotetramer		119 kDa	C4

<sup>1</sup> gerundet, berechnet mit  $M_{\text{GST-WW}}=30.5$  kDa und  $M_{\text{C-PP-GFP}}=29$  kDa

<sup>2</sup> siehe Abbildung 62 A/B/C/D

Die Absorption bei 490 nm zeigte die Anwesenheit von GFP in diesen Assoziaten, das Verhältnis von A280/A490 implizierte außerdem die Anwesenheit von GST-WW. Die beiden Peaks (C3, C4) wurden im Lauf der Gelfiltration isoliert und mit Hilfe von SDS-PAGE als kovalente Kopplungsprodukte von GST-WW und PP-GFP identifiziert (Abbildung 63 B). Dabei wurde Peak C3 einem Heterotrimer zugeordnet, bestehend aus dem nicht-kovalenten GST-WW-Dimer, das zu einem Molekül PP-GFP disulfidverbrückt ist und ein Molekulargewicht von etwa 90 kDa aufweisen sollte (Tabelle 20). Peak C4 unterschied sich von C3 vermutlich durch ein weiteres Molekül PP-GFP, das kovalent an das zweite Molekül GST-WW gekoppelt vorlag (Molekularmasse des kovalenten Heterotetramers:  $\sim 120$  kDa). Untersuchungen des Sedimentationsverhaltens der isolierten Probe von Peak C3 durch analytische Ultrazentrifugation bestätigten das erwartete Molekulargewicht von 90 kDa (Daten nicht gezeigt).

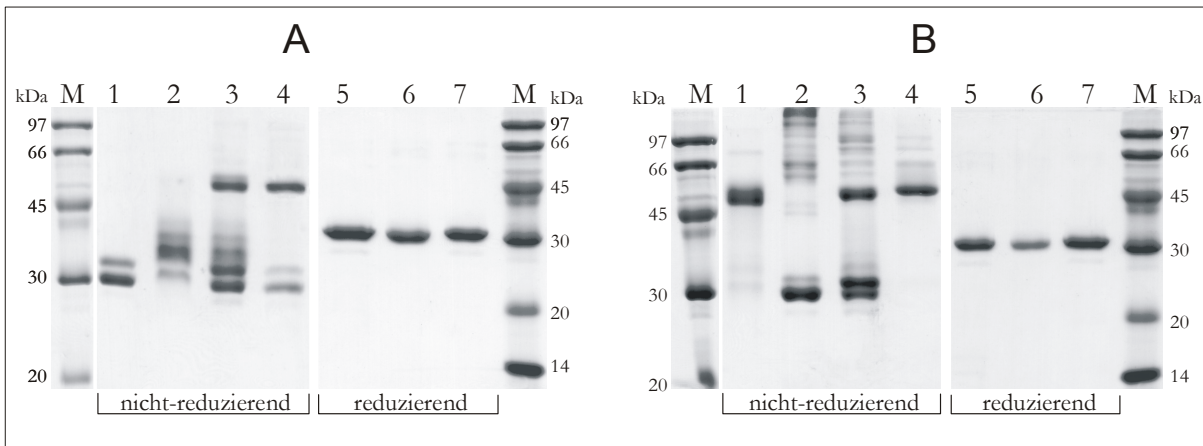
Neben den genannten Kopplungsprodukten, die Peak C3 und C4 in Abbildung 62 C entsprechen, wurden zusätzlich weitere hochmolekulare Spezies beobachtet (Elutionsvolumen  $< 13$  ml), die ebenfalls GFP enthielten, und wahrscheinlich durch Disulfidverbrückung zwischen PP-GFP und Homooligomeren (z.B. kovalentes Homotetramer oder Homohehexamer, Tabelle 20) von GST-WW entstanden waren.

Diese höhermolekularen Assoziate zeigten sich in den Kopplungen in Gegenwart des Redoxsystems (3.4 mM GSSG/0.6 mM GSH) dagegen nicht. Außerdem wurde unter diesen Bedingungen offensichtlich nur ein Kopplungsprodukt signifikant populiert (Peak D3, Abbildung 62 D), das sich dem Heterotrimer aus GST-WW (Homodimer), disulfidverbrückt zu einem PP-GFP-Monomer, zuordnen ließ (~ 90 kDa). Eine zweite Spezies mit einer Größe von etwa 120 kDa (ggf. Heterotetramer) zeigte sich nur als Schulter des Peaks D3. Diese Verteilung spiegelte das Gleichgewicht bei der Kopplungsreaktion wider, das sich unter definierten Redoxbedingungen einstellt. Da das Redoxsystem Glutathion im Überschuß zur WW- und Polyprolin-Fusion eingesetzt wurde, lag nur ein bestimmter Anteil der WW-Domänen im disulfidverbrückten Komplex vor, während die übrigen eingesetzten Komponenten ein gemischtes Disulfid mit GSSG ausbildeten (vgl. Abschnitt III.3.4.3). Infolge der beiden identischen Bindestellen eines GST-WW-Dimers für prolinreiche Liganden, wird bei der nicht-quantitativen Kopplung unter Redoxbedingungen - der statistischen Verteilung entsprechend - stets das Heterotrimer stärker populiert als das Heterotetramer.

In Ergänzung zu den Gelfiltrations-Analysen der Kopplung von GST-WW und PP-GFP konnte unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE eine Unterscheidung von kovalent und nicht-kovalent assoziierten Spezies vollzogen werden. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen blieben die disulfidverbrückten Oligomere während der elektrophoretischen Auftrennung erhalten, während in Gegenwart eines Reduktionsmittels die Komponenten in Form ihrer Monomere analysiert wurden.

Bei Analyse der Kopplung unter Verwendung des Redoxsystems (GSSG/GSH), konnte im SDS-Gel eine Spezies detektiert werden, die aus dem Vergleich des Laufverhaltens der eingesetzten Komponenten als disulfidverbrückter Komplex der Monomere von GST-WW und PP-GFP angesehen wurde (Abbildung 63 A, Spuren 1-3). Das erwartete Molekulargewicht für dieses Heterodimer betrug etwa 60 kDa, die entsprechende Bande im nicht-reduzierenden Gel zeigte jedoch eine apparent geringere Größe. Ursache dafür ist wahrscheinlich das veränderte Laufverhalten disulfidverbrückter Proteine unter denaturierenden Bedingungen. (Der mitgeführte Molekulargewichtsstandard enthielt ein Reduktionsmittel im Probenpuffer.) Der während der Gelfiltration isolierte Komplex (Peak D3) zeigte im SDS-Gel im Wesentlichen zwei Banden, die dem Heterodimer (GSTWW-PP-GFP) und einem freien GST-WW entsprachen, wobei letzteres aus dem nicht-kovalenten GST-WW-Dimer stammt (Spur 4 in Abbildung 63 A). Sämtliche Spezies dieses Kopplungsansatzes zeigten im nicht-reduzierenden Gel Doppel- bzw. Mehrfachbanden, die vermutlich die gemischten Disulfide der jeweiligen Komponenten mit Glutathion repräsentierten. Die Analyse durch reduzierende SDS-PAGE bestätigte, daß es sich dabei nicht um proteolytischen Abbau oder anderweitige Inhomogenitäten der Probe handelte.





**Abbildung 63:** Analyse der kovalenten Assoziation von GST-WW-K35C und C-PP-GFP durch SDS-PAGE. **(A)** Disulfidverbrückung in Gegenwart von GSSG/GSH, nicht-reduzierende Auftragung: 1) Kontrolle GST-WW-K35C, 2) Kontrolle C-PP-GFP, 3) Kopplungsansatz, 4) durch Gelfiltration isolierter Komplex (Peak D3). Reduzierende Auftragung: 5) Kontrolle GST-WW-K35C, 6) Kontrolle C-PP-GFP, 7) durch Gelfiltration isolierter Komplex (Peak D3). **(B)** Disulfidverbrückung vermittelt durch Luftsauerstoff und  $\text{CuCl}_2$ , nicht-reduzierende Auftragung: 1) Kontrolle C-PP-GFP (Homodimer), 2) Kontrolle GST-WW-K35C, 3) Kopplungsansatz, 4) durch Gelfiltration gereinigter Komplex (Peak C4), reduzierende Auftragung: 5) Kontrolle GST-WW-K35C, 6) Kontrolle C-PP-GFP, 7) durch Gelfiltration gereinigter Komplex (Peak C4).

Bei der durch Luftsauerstoff vermittelten Disulfidverbrückung wurde, analog zur Verfahrensweise bei der Kopplung der isolierten WW-Domäne, vom oxidierten Homodimer von C-PP-GFP ausgegangen, um nachfolgend anhand einer Thiol-Disulfid-Austausch-Reaktion die Komplexbildung mit dem reduzierten GST-WW-K35C zu bewerkstelligen (vgl. Abschnitt III.3.4.6). Das PP-GFP-Homodimer zeigte im nicht-reduzierenden Gel eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 50 kDa (Abbildung 63 B, Spur 1). Unter Ausbildung des Komplexes wurde dieses reduziert, sichtbar durch die zusätzliche Bande um 30 kDa im Kopplungsansatz (Spur 3). Im Vergleich zur Kopplung in Anwesenheit eines Redoxsystems, entstanden im Verlauf der Oxidation durch Luftsauerstoff auch zahlreiche höhermolekulare Spezies, die sowohl im Kopplungsansatz als auch für die GST-WW-Kontrolle beobachtet wurden (Spuren 3 und 2). Die Bildung dieser kovalenten Oligomere war mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die (unspezifische) intermolekulare Disulfidverbrückung von GST-WW-Molekülen zurückzuführen, die sowohl über das Cystein der WW-Domäne als auch über die von GST erfolgt sein könnte. Die Vielzahl der höhermolekularen Banden wies eher darauf hin, daß beides zutrifft. Die SDS-PAGE-Analyse des isolierten Komplexes von GST-WW und PP-GFP (Peak C4) zeigte eine dominante Bande im nicht-reduzierenden Gel, die dem kovalenten Heterodimer GST-WW-PP-GFP entsprach (Spur 4). Daneben wurde jedoch kein freies GST-WW detektiert, wie im Fall der Komplexbildung mit GSSG/GSH, was dafür sprach, daß die genannte Fraktion von Peak C4 das Heterotetramer von GST-WW und PP-GFP enthielt (Tabelle 20). Die reduzierende Auftragung der Ansätze verdeutlichte erneut, daß im Verlauf der Kopplung kein proteolytischer Abbau zu verzeichnen war und GST-WW und PP-GFP ein identisches Laufverhalten im reduzierenden SDS-Gel zeigen (Spuren 5-7).

Generell sollten Ergebnisse der Analyse disulfidverbrückter Spezies anhand von nicht-reduzierender SDS-PAGE jedoch mit gewisser Zurückhaltung zu interpretiert werden. Obwohl die hier dargestellten Ergebnisse größtenteils konsistent mit den Daten der analytischen Gelfiltration waren, ist die Methode der nicht-reduzierenden SDS-PAGE durchaus artefaktanfällig und kann ggf. zu unspezifischer Disulfidverbrückung während der Probenvorbereitung führen. Da der eingesetzte Probenpuffer sowohl denaturierende Konzentrationen von SDS enthält als auch ein basisches Milieu bereitstellt, ist die Gefahr eines rapiden Thiol-Disulfid-

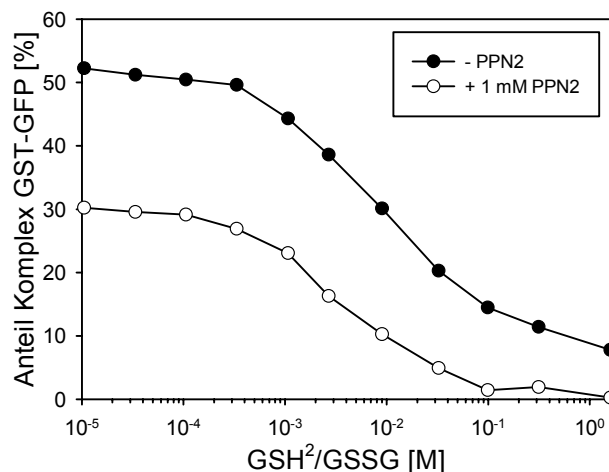


Austausches in Gegenwart von freien Thiolgruppen gegeben, bei dem bereits gebildete Disulfidbrücken reduziert bzw. neue gebildet werden könnten. Um die Aussage der Analyse nicht zu verfälschen war es daher gängige Praxis, freie Thiolgruppen mit einem Überschuß an Iodacetamid umzusetzen, die damit irreversibel modifiziert wurden. Zusätzlich wurde auf eine Erhitzung der so behandelten Proben verzichtet, da unspezifische Oxidationen und andere chemische Modifikationen durch erhöhte Temperaturen begünstigt werden (Abschnitt II.10.11).

Die Entstehung des gewünschten kovalenten Komplexes von GST-WW und PP-GFP ließ sich sowohl durch Oxidation mittels Luftsauerstoff als auch den Einsatz eines Redoxsystems zeigen. Dabei ist die Ausbeute im Fall des Redoxsystems durch die Einstellung des Gleichgewichtes limitiert, allerdings wird auch die Bildung unspezifisch gekoppelter hochmolekularer Spezies vermieden. Die Oxidation durch Luftsauerstoff führt theoretisch zu einer quantitativen Disulfidverbrückung, hat aber den Nachteil, daß bestimmte Nebenreaktionen, wie die Bildung von kovalenten Homooligomeren, nicht unterdrückt werden.

#### III.3.5.4. Spezifität der Assoziation

Um die Bedeutung der Affinität von WW-Domäne zur prolinreichen Sequenz bei der Kopplung von GST-WW und PP-GFP zu untermauern, wurden die redoxabhängigen Kopplungsausbeuten in An- bzw. Abwesenheit eines kompetitiven Inhibitors der Kopplung (cysteinfreier Peptidligand PPN2) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte chromatographisch anhand der GFP-Absorption bei 490 nm.



**Abbildung 64:** Spezifität der Disulfidverbrückung. Konkurrenz der kovalenten Kopplung von GST-WW-K35C mit einem (nicht-kovalent bindenden) Kompetitor der Kopplung (PPN2) in 'WW-Puffer TB' + 1 mM EDTA bei 25°C, Inkubationszeit 75 min. Gezeigt ist die redoxabhängige Inhibition der kovalenten Komplexbildung von 100 µM GST-WW-K35C und 50 µM C-PP-GFP ohne bzw. mit 1 mM PPN2 (4 mM Glutathion). Die Angabe des Komplexanteils (Ordinate) bezieht sich auf die eingesetzte Konzentration C-PP-GFP.

In Abwesenheit von PPN2 zeigte sich zunächst die Redoxabhängigkeit der Komplexbildung, die bereits bei der Disulfidverbrückung der isolierten WW-Domäne mit prolinreichen Liganden beobachtet wurde (Abschnitt III.3.4.3). Unter oxidierenden Bedingungen wurde die höchste Komplexausbeute von etwa 50 % bzgl. des eingesetzten C-PP-GFP erreicht, während unter reduzierenden Bedingungen immer noch etwa 10 % des disulfidverbrückten Komplexes populiert waren (Abbildung 64). Eine ähnliche hohe Stabilität unter diesen Bedingungen hatte sich auch für den kovalenten Komplex von WW-K35-C mit dem Peptidliganden PPC1 gezeigt (Abschnitt III.3.4.4). Das Reduktionspotential von Glutathion war unter diesen Bedingungen offensichtlich nicht ausreichend, um den GST-GFP-Komplex vollständig zu reduzieren. Ein

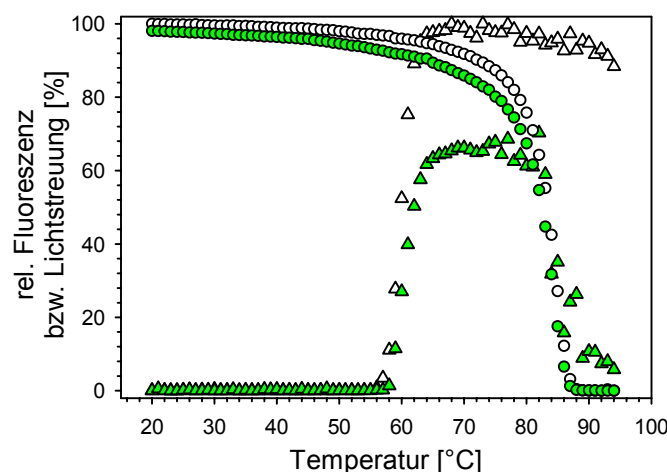
Einfluß der intrinsischen Affinität von GST zu Glutathion auf das Redoxverhalten des Komplexes kann zwar nicht ausgeschlossen werden, erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da die GSH-Bindungsstelle von GST sich nicht in räumlicher Nähe zur WW-Domäne befinden sollte (McTigue et al., 1995). Diese Stabilisierung der Disulfidbrücke ließ sich in Gegenwart von 1 mM des cysteinfreien Liganden PPN2 offensichtlich weitestgehend aufheben, was sich im Verschwinden des Kopplungsproduktes unter reduzierenden Bedingungen zeigte. Ebenso wurde die Komplexausbeute unter oxidierenden Bedingungen auf 30 % herabgesetzt. PPN2 agierte dabei aller Wahrscheinlichkeit nach als Kompetitor der Bindung an die WW-Domäne und setzte die effektive Konzentration von C-PP-GFP an der WW-Domäne herab, was sich in der verminderten Komplexbildung äußerte.

Dieses Experiment bestätigte, daß die Ausbildung und Stabilisierung des disulfidverbrückten Komplexes durch die Affinität der WW-Domäne des GST-WW zur prolinreichen Sequenz von PP-GFP vermittelt wird.

### III.3.5.5. Thermische Stabilität des GST-GFP-Komplexes

In einer abschließenden Untersuchung der thermischen Stabilität des disulfidverbrückten Komplexes von GST-WW und PP-GFP wurde versucht zu beurteilen, ob sich die beteiligten Komponenten im disulfidverbrückten Komplex anders verhalten als in ihrer isolierten Form. Daraus sollte sich ggf. ableiten lassen, ob infolge der kovalenten Kopplung mit einer Beeinträchtigung von Funktion und Stabilität der gekoppelten Proteine zu rechnen ist.

Sowohl GST-WW als auch PP-GFP wiesen ein charakteristisches Verhalten im Verlauf der thermischen Denaturierung auf, die durch Messung der Lichtstreuung bzw. der GFP-Fluoreszenz untersucht wurde (Abschnitt II.12.8). Im Fall von GST-WW-K35C im isolierten Zustand zeigte sich eine deutliche Zunahme der Lichtstreuung bei einer Temperatur von etwa 58°C, die auf die Aggregation des Proteins infolge einer irreversiblen, kooperativen Entfaltung zurückgeführt wurde (Abbildung 65). C-PP-GFP wies dagegen eine deutlich höhere thermische Stabilität auf. Ein signifikanter Abfall der charakteristischen Fluoreszenz des Proteins setzte erst bei Temperaturen über 70°C ein. Dieser Verlust der Fluoreszenzeigenschaft wurde ebenfalls mit der Entfaltung des Proteins korreliert, die bei etwa 87°C abgeschlossen zu sein schien. Eine Aggregation von C-PP-GFP ließ sich nicht feststellen.



**Abbildung 65:** Vergleich der thermischen Stabilitäten des disulfidverbrückten Komplexes von C-PP-GFP und GST-WW-K35C mit den isolierten Komponenten. Die Analysen erfolgten in 'WW-Puffer P-FL' bei einer Proteinkonzentration von 500 nM durch Verfolgung der GFP-Fluoreszenz bei 512 nm (Anregung 492 nm) für den kovalenten Komplex GSTWW-PPGFP (●) und C-PP-GFP (○) bzw. der Lichtstreuung bei 600 nm für den kovalenten Komplex (▲) sowie GST-WW-K35C (△). Die beobachteten Intensitäten wurden jeweils auf die maximalen Signale normiert.

Die Analyse des disulfidverbrückten Komplexes erfolgte anhand einer mittels Gelfiltration isolierten Probe des durch Luftsauerstoff gebildeten Heterotetramers, bestehend aus einem GST-WW-Dimer mit zwei kovalent gekoppelten C-PP-GFP-Molekülen (vgl. Abschnitt III.3.5.3, Peak C4). Die Konzentration des Komplexes entsprach denen der zuvor untersuchten Einzelkomponenten (500 nM). Dabei zeigte der Komplex eine bei etwa 57°C einsetzende Zunahme der Lichtstreuung, die allerdings nicht die Intensität erreichte, die für freies GST-WW beobachtet wurde und auch keinen Einfluß auf die GFP-Fluoreszenz hatte. Bei Temperaturen über 80°C wurde dagegen wieder ein Abfall des Streusignals beobachtet, der offensichtlich gleichzeitig mit dem Verlust der GFP-Fluoreszenz einherging. Da innerhalb eines bestimmten Bereichs die Intensität der Lichtstreuung proportional zur Größe der gebildeten Aggregate ist, wurde vermutet, daß der aggregierte Komplex zunächst kleinere Partikel als die Aggregate von GST-WW bildete. Die dann einsetzende Abnahme des Streusignals wurde dagegen auf eine weitere, signifikante Größenzunahme infolge fortschreitender Aggregation zurückgeführt und resultierte in der Akkumulation von erheblich größeren, makroskopisch sichtbaren Partikeln, die sich trotz der kontinuierlichen Durchmischung der Probe in der Küvette absetzten. Das parallele Verschwinden des Fluoreszenzsignals legte nahe, daß die zweite Aggregationsphase offensichtlich eine Konsequenz der Entfaltung von PP-GFP war.

An dieser Stelle sollte jedoch erwähnt werden, daß sich anhand von vergleichenden Analysen irreversibler Entfaltungsprozesse nur begrenzt Aussagen zur Stabilität der untersuchten Proteine treffen lassen. Sie sind demzufolge eher als qualitative Beschreibungen der Vorgänge anzusehen. Trotz Berücksichtigung dieses Aspektes ließ sich für den disulfidverbrückten Komplex von GST-WW und PP-GFP jedoch erkennen, daß die thermische Stabilität der Einzelkomponenten durch die Komplexbildung nicht wesentlich beeinflußt wird. Dieser Befund schließt die Beobachtung nicht aus, daß die Komponenten im Komplex dennoch ein verändertes Verhalten aufweisen können, worauf z.B. die Existenz eines zweiten Aggregationsprozesses hinwies. Diese ("neue") Eigenschaft war offensichtlich eine direkte Konsequenz der kovalenten Assoziation beider Komponenten.

## IV. Diskussion

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Etablierung eines Kopplungssystems zur kovalenten Assoziation von Proteinen basierend auf WW-Domänen und prolinreichen Liganden. Die vorangegangenen Untersuchungen der biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften der Komponenten, die diese Assoziation vermitteln, schufen eine wesentliche Grundlage für die dazu erforderlichen Modifikationen der Moleküle. Im folgenden Abschnitt wird die Charakterisierung der WW-Domäne FBP11-WW1 im Kontext des derzeitigen Wissenstandes über WW-Domänen allgemein diskutiert und anschließend näher auf ihre Eignung als Kopplungsmodul eingegangen. Anschließend sollen Möglichkeiten und Limitationen des erarbeiteten Kopplungsverfahrens, sowie prinzipielle Aspekte einer Anwendung des Systems in biotechnologisch-medizinischer Forschung und Entwicklung erläutert werden.

### IV.1. Stabilität, Funktion und Struktur von FBP11-WW1

Der überwiegende Teil der ersten Erkenntnisse zu den Bindungseigenschaften von WW-Domänen wurde durch Studien mit Hilfe von GST-Fusionen der Domäne erlangt (Chen & Sudol, 1995; Chan et al., 1996; Bedford et al., 1997; Chen et al., 1997; Ermekova et al., 1997). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde FBP11-WW1 in Form von GST-WW hergestellt, jedoch erfolgte ein Großteil der Experimente mit der isolierten WW-Domäne, die durch proteolytische Spaltung des GST-Fusionsproteins erhalten wurde. Untersuchungen zur Struktur, Stabilität sowie anderen biophysikalischen Eigenschaften sind für die isolierte WW-Domäne von FBP11-WW1 bisher nicht beschrieben. Eine Ausnahme bilden lediglich neuere Studien, in denen vergleichende Analysen zur Bindungsspezifität von WW-Domänen, darunter auch FBP11-WW1, durchgeführt wurden (Otte et al., 2003; Kato et al., 2004).

#### IV.1.1. Stabilität der FBP11-WW1-Varianten

Im Verlauf der Arbeit wurden insgesamt fünf Varianten der isolierten WW-Domäne FBP11-WW1 hergestellt und charakterisiert. Dabei handelte es sich einerseits um drei Varianten des cysteinfreien Wildtyps, WW-wt, WW-AKSM und WW- $\Delta\epsilon t$ , die sich lediglich in der Zusammensetzung ihrer N-terminalen Aminosäuren unterschieden. Andererseits wurden von WW-wt die beiden Cystein-Varianten WW-D24C und WW-K35C abgeleitet, die im Zuge der Etablierung des Kopplungssystems einen Assoziationspartner des disulfidverbrückten Komplexes von WW-Domäne und prolinreichen Liganden darstellten (Abbildung 8).

Das charakteristischste Strukturmerkmal von WW-Domänen besteht in der Ausbildung eines dreisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblattes (Macias et al., 1996), in das mehrere aromatische Aminosäuren involviert sind (W17, W39, Y28 u.a.). Bereits aus dem charakteristischen Fern-UV-CD-Spektrum von WW-Domänen, dessen auffälligstes Merkmal das Maximum der Elliptizität bei 230 nm ist, ließ sich für sämtliche Varianten von FBP11-WW1 (WW-wt, WW-AKSM, WW- $\Delta\epsilon t$ , WW-D24C, WW-K35C) das Vorhandensein der typischen WW-Domänen-Faltung ableiten. Diese Vermutung bestätigte sich durch Aufnahme von  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren unter ähnlichen Bedingungen bei pH 6. Auch hier zeigten alle Varianten eine gute Signaldispersion mit den charakteristischen Signalen der beiden indolischen  $\text{N}_\epsilon\text{H}$ -Protonen von W17 und W39, die klare Anzeichen der Ausbildung einer gefalteten Struktur waren. Analoge Untersuchungen sind auch für andere WW-Domänen beschrieben, in denen sich sehr ähnliche spektroskopische Eigenschaften offenbarten. Davon stellt die YAP-WW-Domäne (Klasse I) das bestuntersuchte System dar (Koepf et al., 1999a; Koepf et al., 1999b), aber auch im Fall der murinen FBP28-WW-Domäne (Klasse II, Macias et al., 2000; Ferguson et al., 2001a) sowie der hPin1-WW-Domäne

(Klasse IV, Jäger et al., 2001) stellten sich die charakteristischen Strukturmerkmale gefalteter WW-Domänen heraus.

Aus der Schlußfolgerung, daß FBP11-WW1 sowie die abgeleiteten Varianten im gefalteten Zustand vorlagen, ergab sich unmittelbar die Frage nach der Stabilität der isolierten WW-Domäne, die anhand von Analysen der chemisch bzw. thermisch induzierten Entfaltung (bzw. Rückfaltung) der WW-Domäne untersucht wurden. Am Beispiel von WW-AKSM wurde die GdnHCl-vermittelte Denaturierung der Domäne verfolgt. Der dabei beobachtete breite Übergang war reversibel und ist typisch für Proteine dieser Größe, deren Faltung nur durch vergleichsweise wenig strukturbildende Wechselwirkungen stabilisiert wird (Alexander et al., 1992). Die Anpassung an ein Zwei-Zustandsmodell lieferte eine freie Energie der Entfaltung ( $\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$ ) von etwa 8.5 kJ/mol und lag damit im Bereich von Stabilitäten, die ebenso für andere WW-Domänen (vgl. Abschnitt III.1.4.1) sowie für verschiedene  $\beta$ -Faltblatt-Proteine vergleichbarer Größenordnung bestimmt wurden (Koepf et al., 1999b; Ferguson et al., 2001a; Deechongkit & Kelly, 2002; Reid et al., 1998; Knapp et al., 1998).

Vergleichende Untersuchungen zur Stabilität der drei FBP11-WW1-Varianten WW-wt, WW-AKSM und WW- $\Delta kt$  erfolgten mikrokalorimetrisch durch Verfolgung der thermisch induzierten Entfaltung. Auch hier zeigte sich wieder ein breiter Übergang, der einen Temperaturbereich von 35°C bis 95°C umfaßte. Der Übergangsmittelpunkt ( $T_m$ ) von WW-wt und WW-AKSM lag mit 63°C um 2°C höher als der von WW- $\Delta kt$ , was auf die Anwesenheit der N-terminalen Kinase-Erkennungssequenz in den ersten beiden Varianten zurückgeführt werden könnte. Da die Varianten WW-wt und WW-AKSM ein sehr ähnliches Verhalten bei der thermischen Entfaltung zeigten, können wesentliche Beiträge zur Stabilität der WW-Domäne durch die vier hinzugefügten Aminosäuren AKSM höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden. Neuere Arbeiten, in denen N- und C-terminal trunke Varianten der WW-Domäne FBP28-WW (auch Klasse II) untersucht wurden, erwähnen ebenfalls eine untergeordnete Rolle der Aminosäurepositionen 10 bis 14 bzw. 43 bis 46 bei der Stabilisierung dieser Domäne (Nguyen et al., 2003). Im Gegensatz dazu hatten Sequenzanalysen und Strukturuntersuchungen an WW-Domänen der Klassen I und IV nahegelegt, daß bestimmte Aminosäuren vor Tryptophan W17 für die strukturelle Integrität der isolierten WW-Domäne relevant waren. So ist z.B. Prolin P14 innerhalb dieser Klassen fast ausnahmslos konserviert (Abbildung 4) und an der Stabilisierung der WW-Faltungstopologie beteiligt (Macias et al., 1996; Verdecia et al., 2000). Ungeachtet der hohen strukturellen Homologie aller WW-Domänen, scheinen sich die Klassen I/IV und II in diesem Detail ihrer strukturbildenden Kräfte jedoch zu unterscheiden.

Die nähere Analyse der bereits bei etwa 30°C einsetzenden thermischen Denaturierung von FBP11-WW1 anhand der charakteristischen indolischen NH-Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum wies auf einen wenig kooperativen Überhang hin, der sich über einen breiten Temperaturbereich (bis 95°C) erstreckte und zumindest bis 75°C vollständig reversibel war. Untersuchungen der thermischen Stabilität von anderen WW-Domänen führten zu sehr ähnlichen Ergebnissen (Koepf et al., 1999a; Ferguson et al., 2001a; Jäger et al., 2001). Diese Merkmale sind typisch für isolierte Proteindomänen, die nicht über einen ausgeprägten hydrophoben Kern verfügen, der normalerweise wesentlich zur Stabilität der nativen Struktur von Proteinen beiträgt. Bedingt durch ihre geringe Größe können kleine Proteine dagegen nur eine begrenzte Anzahl von stabilisierenden Wechselwirkungen im Molekülinneren ausbilden. Obwohl WW-Domänen als eigenständig faltende Bindemodule von Proteinen angesehen werden (Sudol, 1998), kann davon ausgegangen werden, daß sie im Kontext ihrer natürlichen Proteinumgebung eine zusätzliche Stabilisierung durch den Kontakt mit ihren Wirtsproteinen erfahren, wie es z.B. für die WW-Domäne von Dystrophin beobachtet wurde (Rentschler et al., 1999; Huang et al., 2000).

Für isolierte WW-Domänen sind mehrere Ansätze beschrieben, die eine Stabilisierung der Domäne selbst zum Ziel hatten und gleichzeitig demonstrieren, daß die WW-Domäne ein attraktives Ziel für *Protein Design*-Studien darstellt. So konnte über eine Zyklisierung des Peptidrückgrates von Pin1-WW eine Stabilisierung der WW-Domäne erreicht werden, die sich in einem um 10°C erhöhten  $T_m$  äußerte (Deechongkit & Kelly, 2002). Im Fall von hYAP-WW führte die Mutation von 3 rational ausgewählten Aminosäuren im  $\beta$ -Faltblatt zu einer Stabilisierung, die den  $T_m$  um 28°C erhöhte, sich allerdings auch im Verlust der ursprünglichen Bindungseigenschaften äußerte (Jiang et al., 2001). Nicht zuletzt stellt die WW-Domäne ein leicht zugängliches Modellsystem für Untersuchungen der Proteinfaltung dar. So trugen kinetische Studien zur Strukturbildung von WW-Domänen anhand von Temperatursprungexperimenten wesentlich zum derzeitigen Verständnis von Stabilität und Faltungsmechanismus isolierter  $\beta$ -Faltblattstrukturen bei. (Jäger et al., 2001; Ferguson et al., 2001b; Ferguson et al., 2001a; Nguyen et al., 2003; Karanicolas & Brooks, III, 2003).

#### IV.1.2. Biochemische Charakterisierung der PPLP(P)-Bindung

WW-Domänen vermitteln Protein-Protein-Wechselwirkungen durch die Bindung von prolinreichen Sequenzen (Sudol et al., 1995b; Chen & Sudol, 1995). Basierend auf den Bindungsspezifitäten verschiedener WW-Domänen wurden unterdessen mehrere Klassen definiert, in die sich WW-Domänen einordnen lassen (vgl. Abschnitt I.2.2, Macias et al., 2002; Otte et al., 2003). FBP11-WW1 stellt dabei eine WW-Domäne der Klasse II dar, deren Liganden das Konsensusmotiv PPLP enthalten (Bedford et al., 1997; Bedford et al., 1997). Diese Interaktion war ursprünglich anhand der Bindung von FBP11 an Formin entdeckt worden (Chan et al., 1996), während in späteren Arbeiten eine Reihe von weiteren WW-bindenden Proteinen (WBP) als Liganden von FBP11-WW1 identifiziert wurden (Bedford et al., 1997; Faber et al., 1998). Die hier verwendeten prolinreichen Liganden wurden im wesentlichen von der prolinreichen Sequenz in WBP-5 (P<sub>7</sub>LPP) abgeleitet, für das die höchste Affinität zu FBP11-WW1, fusioniert an GST, beschrieben wurde (Bedford et al., 1997). Ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Bindung von verschiedenen PPLP-Liganden an die isolierte WW-Domäne FBP11-WW1 im Hinblick auf die Etablierung des kovalenten Kopplungssystems.

Sämtliche untersuchten Varianten von FBP11-WW1 zeigten eine vergleichbare Bindung an den cysteinfreien Liganden PPN2 ( $\beta$ -AGP<sub>7</sub>LPP) mit Dissoziationskonstanten im Bereich von 125 bis 185  $\mu$ M, wobei die cysteinfreien Varianten WW-wt, WW-AKSM und WW- $\Delta$ ket untereinander noch geringere Unterschiede aufwiesen ( $150 \pm 5 \mu$ M). Darin bestätigte sich, daß die N-terminalen Sequenzunterschiede dieser Varianten keinen signifikanten Einfluß auf das Bindungsverhalten hatten. Im Fall der Cystein-Varianten WW-D24C und WW-K35C zeigten die Analysen, daß die Einführung von Cysteinen an den Positionen 24 und 35 (Loop 1 bzw. Loop 2) nicht mit den Bindungseigenschaften der WW-Domäne interferierten. Die relativ niedrige Affinität der Bindung, die sich in mikromolaren Dissoziationskonstanten äußert, spiegelt vermutlich den transienten Charakter der Proteinkomplexe wider, deren Bildung WW-Domänen im Kontext zahlreicher zellulärer Prozesse vermitteln (Sudol et al., 2001). Die hier bestimmten Dissoziationskonstanten lagen allerdings im Widerspruch zu Angaben aus früheren Arbeiten, in denen nanomolare  $K_D$ -Werte für FBP11-WW1 beschrieben wurden (Bedford et al., 1997; Schmidt et al., 2001; Günther et al., 2001). Diese Arbeiten involvierten jedoch kinetische Oberflächenplasmonresonanz-Messungen mit oligomeren Fusionsproteinen der WW-Domäne (z.B. GST) und unterlagen daher Aviditätseffekten, die um Größenordnungen zu niedrige  $K_D$ -Werte lieferten (Ladbury et al., 1995; Müller et al., 1998b). Gleichartige Analysen anhand der isolierten FBP11-WW1 ergaben dagegen Affinitäten, die in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit stehen (125  $\mu$ M, Kato et al., 2004). Auch für zahlreiche

andere WW-Domänen wurden Dissoziationskonstanten bestimmt, die überwiegend im mikromolaren Bereich liegen (Sudol & Hunter, 2000). Jedoch repräsentieren diese *in vitro* ermittelten Dissoziationskonstanten isolierter WW-Domänen gewissermaßen artifizielle Werte, da die Bindungsstärken oftmals von der Proteinumgebung der WW-Domäne mitbestimmt werden. So zeigte z.B. die Kristallstruktur von Dystrophin im Komplex mit einer prolinreichen Sequenz von  $\beta$ -Dystroglycan eine Interaktion, in die sowohl die WW-Domäne als auch eine benachbarte EF-Hand-Struktur von Dystrophin involviert war (Huang et al., 2000). Ein weiterer Aspekt ist die Beobachtung, daß WW-Domänen in vielen Proteinen, so auch in FBP11, in Form einer Tandem-Anordnung vorliegen (Bedford et al., 1997). Ob diese Organisation zu einem Aviditätseffekt (und damit einer erhöhten Affinität) gegenüber prolinreichen Liganden führt, wurde bisher jedoch nicht gezeigt. Strukturuntersuchungen von Tandem-WW-Domänen weisen eher darauf hin, daß aufgrund des Vorhandenseins mehrerer WW-Domänen, eine gleichzeitige Assoziation unterschiedlicher Bindungspartner erfolgen kann und auf diese Weise die Bildung von Multiprotein-Komplexen bewerkstelligt wird (Wiesner et al., 2002; Fedoroff et al., 2004).

Die Bindung von FBP11-WW1 an die Liganden PPN1 bzw. PPN2 zeigte meßbare Abhängigkeiten von Temperatur, Ionenstärke und pH-Wert des Lösungsmittels. Aus der Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskonstante ließ sich ableiten, daß die Bindung im Wesentlichen durch einen Enthalpiegewinn angetrieben wird. Der Einfluß von Ionenstärke und pH-Wert des Puffers wies auf den Beitrag hydrophober Wechselwirkungen bei der Ligandenbindung hin und legte außerdem die Beteiligung von Histidin H20 in deprotonierter Form nahe. Strukturanalysen anderer Komplexe von WW-Domänen mit prolinreichen Liganden bestätigten, daß die Prolin-Erkennung hauptsächlich durch hydrophobe Aminosäuren im  $\beta$ -Faltblatt der Domäne vermittelt wird (Macias et al., 1996; Zarrinpar & Lim, 2000).

Die Spezifität von FBP11-WW1 für prolinreiche Liganden, die das PPLP-Motiv enthalten, wurde ebenfalls im Verlauf der Arbeit untersucht. Zu diesem Zweck wurden quantitative Bindungsstudien basierend auf Fluoreszenztitration durchgeführt sowie eine Cellulosemembran-gebundene Peptidbibliothek eingesetzt, die eine qualitative Beurteilung der Bindung erlaubte (Spot-Technologie). Mit beiden Methoden ließ sich übereinstimmend zeigen, daß die Störung des PPLP-Motivs (in diesem Fall durch Cystein-Mutationen) mit dem Verlust der Bindungseigenschaften einhergeht. In Längenanalysen des Liganden P<sub>6</sub>LPP erwies sich das Pentapeptid PPLPP als kürzester Ligand, der noch Bindung zu FBP11-WW1 zeigte. Das zusätzliche Prolin, in dem sich dieser Ligand von der Konsensussequenz PPLP unterschied, war dabei lediglich in Abwesenheit längerer Prolinsequenzen essentiell für die Bindung. Quantitative Bindungsmessungen am Beispiel der Liganden PPN1 und PPN2 bestätigten die Bedeutung dieses Prolinrestes. Außerdem wurde festgestellt, daß die Anwesenheit von mindestens 6 Prolinen in Folge ebenfalls für eine Bindung an FBP11-WW1 hinreichend sein kann. Die Eigenschaft, reine Polyprolinsequenzen zu binden, wurde bereits für andere WW-Domänen der Klassen II und III beschrieben und stellt offensichtlich ein gemeinsames Merkmal dieser Klassen dar (Ermekova et al., 1997; Otte et al., 2003; Kato et al., 2004). Diese Vermutung wird durch die Tatsache untermauert, daß offensichtlich nicht alle Interaktionspartner, die für FBP11-WW1 bisher identifiziert wurden, auch über das PPLP-Motiv verfügen. So binden z.B. die Proteine Huntingtin und N-WASP (*Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*) über reine Polyprolinsequenzen (Faber et al., 1998; Mizutani et al., 2004), während Formine und MeCP2 (*Methyl-CpG-binding protein 2*) das PPLP-Motiv involvieren (Chan et al., 1996; Buschdorf & Stratling, 2004). Auch aus Bindungsstudien von Otte et al., 2003 wird deutlich, daß die Substitution des PPLP-Motivs durch andere Aminosäuren zur Aufhebung der Bindung an FBP11-WW1 führt, mit Ausnahme des Austausches von Leucin durch Prolin. Letzterer ging auch hier mit einer Verringerung der Affinität einher. In dieser und weiteren Arbeiten wurde außerdem die Tendenz von FBP11-WW1

untersucht, auch Liganden anderer WW-Domänen-Klassen zu binden. Dabei zeigte sich eine auffallend hohe Spezifität für das PPLP-Motiv. Eine signifikante Bindung an Liganden der WW-Domänen-Klassen I, III und IV konnte nicht nachgewiesen werden (Wagner et al., 1992; Bedford et al., 1997; Hu et al., 2004).

Im Rahmen der Etablierung des kovalenten Kopplungssystems wurde der Einfluß von Cystein-Mutationen auf die Bindungseigenschaften des Liganden untersucht. Die Erkenntnisse aus den vorherigen Bindungsanalysen legten nahe, das PPLP-Motiv der Liganden dabei zu erhalten und das Cystein dementsprechend flankierend anzuordnen. Sowohl mit Hilfe der Spot-Technologie als auch durch Bindungsmessungen mit löslichen cysteinhaltigen Peptidliganden konnte gezeigt werden, daß Cysteine N- und C-terminal des PPLP-Motivs toleriert werden und nicht signifikant mit der Bindung interferieren. Dabei erwies sich ein Abstand von 1-2 Aminosäuren vom PPLP-Motiv unter Einbeziehung weiterer Prolin-Reste als vorteilhaft, wobei die N- oder C-terminale Positionierung des Cysteins möglich zu sein schien. Diese Erkenntnisse spiegeln vermutlich die Notwendigkeit wider, daß Liganden von WW-Domänen stets in Polyprolin-II-Helix-Konformation vorliegen müssen. Die Ursache dafür liegt in der Topologie der Bindungsoberfläche von WW-Domänen, die diese Sekundärstruktur der Liganden erfordert (Nguyen et al., 1998). Es ist davon auszugehen, daß die Anwesenheit von Cystein die Ausbildung einer Polyprolin-II-Helix einschränkt. Dabei scheint entscheidend zu sein, an welcher Stelle sich das Cystein befindet. Terminale Positionen scheinen weniger Einfluß auf die Ausbildung dieser Sekundärstruktur zu haben als Cystein-Insertionen in zentrale Bereiche, die zwangsläufig zu einer Unterbrechung der Prolinsequenz führen. Diese Tendenzen wurden auch in statistischen Analysen der Aminosäurezusammensetzung von natürlichen Polyprolin-II-Helices sichtbar (Stapley & Creamer, 1999). Dabei wurde erwartungsgemäß Prolin als häufigste Aminosäure dieser Strukturelemente identifiziert. Deutlich seltener waren Glutamin, Arginin, Lysin, Threonin, Leucin sowie Cystein, während Glycin mit Abstand am wenigsten gefunden wurde. Letzterer Befund läßt sich mit der hohen sterischen Flexibilität der Aminosäure Glycin erklären, die offensichtlich mit der relativ starren, symmetrischen Struktur einer Polyprolin-II-Helix nicht vereinbar ist. In Zuge dieser Analysen wurden auch positionelle Präferenzen der Aminosäuren innerhalb einer Polyprolin-II-Helix untersucht. Cystein zeigte sich auch hier ausschließlich als peripher auftretende Aminosäure, die prolinreiche Sequenzen flankierte. Dabei war eine geringe Bevorzugung der N-terminalen Positionen zu verzeichnen.

#### **IV.1.3. Strukturelle Basis der PPLP(P)-Bindung durch FBP11-WW1**

Der Gewinn von strukturellen Informationen auf atomarer Ebene stellt eine wesentliche Herausforderung innerhalb der biochemischen Untersuchungen eines Proteins dar. Nur durch Kenntnis der räumlichen Struktur eines Proteins im Kontext seiner Interaktionspartner lassen sich die Aktivität und Eigenschaften von Proteinen auf molekularer Ebene verstehen. WW-Domänen stehen in dieser Hinsicht seit geraumer Zeit im Fokus strukturbiochemischer Arbeiten, aus denen bis zum heutigen Datum ein umfassendes Verständnis ihrer Struktur, Stabilität und biologischen Aktivität, prolinreiche Liganden zu binden, entstanden ist. Dabei kristallisierten sich konservierte Prinzipien heraus, die alle WW-Domänen zur Ausbildung des charakteristischen, dreisträngigen, antiparallelen Faltblattes sowie zur Erkennung von Polyprolin-Sequenzen involvieren (Macias et al., 1996; Nguyen et al., 1998; Zarrinpar & Lim, 2000). Weniger verstanden blieben bisher die molekularen Grundlagen der Spezifität, mit der WW-Domänen unterschiedliche Bindungsmotive in prolinreichen Liganden erkennen. Laut der in diesem Kontext eingeführten Einteilung der WW-Domänen in die Klassen I bis IV gehört FBP11-WW1 mit seiner Spezifität für das PPLP-Motiv der Klasse II an (Bedford et al., 1997; Macias et al., 2002). Während sich die Klassen I (PPxY-Motiv) und IV (phosphoSP/phosphoTP) klar von den übrigen Klassen abgrenzen lassen, wird die genaue Differenzierung von WW-Domänen in den

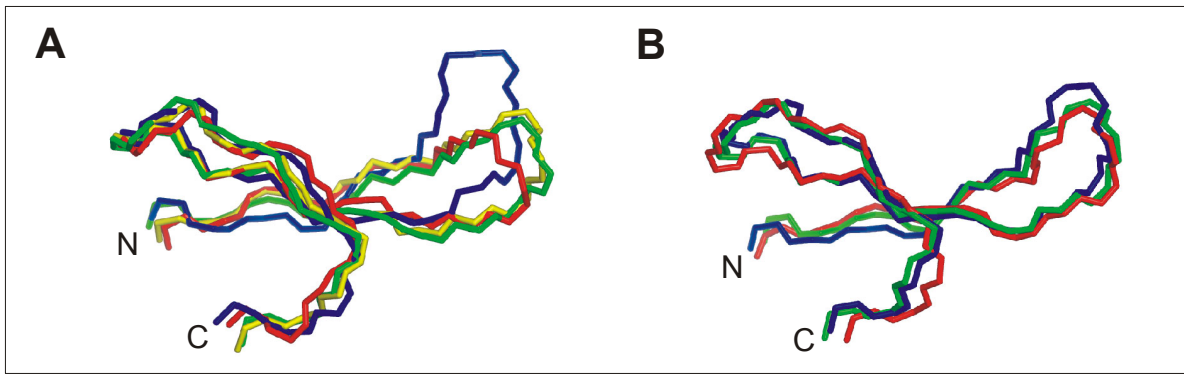


Klassen II (PPLP/polyP-Motiv) und III (PGM-Motiv) noch kontrovers diskutiert (Macias et al., 2002; Otte et al., 2003; Kato et al., 2004). Die Ursache dafür liegt mit Sicherheit auch in der Tatsache, daß bisher keine strukturellen Informationen von WW-Domänen der Klassen II und III in Gegenwart ihrer Liganden verfügbar waren. Beschrieben wurden lediglich die NMR-Strukturen von FBP28-WW und dem PRP40-WW-Tandem in ungebindenem Zustand (Macias et al., 2000; Wiesner et al., 2002). Im Gegensatz dazu sind mehrere Strukturen von Komplexen der Klassen I und IV beschrieben (Macias et al., 1996; Huang et al., 2000; Pires et al., 2001; Kanelis et al., 2001; Verdecia et al., 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die strukturelle Aufklärung der NMR-Struktur von FBP11-WW1 im freien Zustand sowie im Komplex mit dem Peptidliganden APPTPPPLPP, einem Fragment des Proteins Formin, anhand dessen Interaktion mit WW-Domänen FBP11-WW1 ursprünglich identifiziert wurde (Chan et al., 1996). FBP11-WW1 zeigte die charakteristische WW-Faltungstopologie, in Form des dreisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblattes. Neben den klassischen intramolekularen Wechselwirkungen innerhalb des Faltblattes (H-Brücken), wurde die Struktur im Wesentlichen durch einen hydrophoben Cluster auf der Rückseite der  $\beta$ -Faltblattoberfläche stabilisiert, der von den streng konservierten Aminosäuren (W17, Y28, P42) gebildet wird und wie eine Klammer wirkt (Macias et al., 1996). Weitere Aminosäuren N-terminal von W17 scheinen an der Stabilisierung von FBP11-WW1 nicht beteiligt zu sein, wie es z.B. auch für FBP28-WW beschrieben wurde. Diese WW-Domäne gehört mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls zur Klasse II (Macias et al., 2000; Nguyen et al., 2003). Im Fall von FBP11-WW1 wurde diese Vermutung durch einen Vergleich der thermischen Stabilitäten der Varianten WW-wt und WW-AKSM untermauert, in dem sich keine meßbaren Unterschiede zeigten (vgl. Abschnitt IV.1.1). Anders verhält es sich dagegen bei WW-Domänen der Klassen I und IV, in denen mindestens ein weiterer N-terminaler Prolinrest den genannten Cluster ergänzt (Macias et al., 1996; Kanelis et al., 2001; Ranganathan et al., 1997).

Die Erkennung und Bindung der Prolin des Liganden erfolgt im Fall von FBP11-WW1 durch zwei räumlich getrennte Prolin-Bindungsstellen, von denen eine in allen WW-Domänen konserviert ist (Y28, W39, Macias et al., 1996). Anhand weiterer Interaktionen von Prolinen des Liganden mit hydrophoben Aminosäuren des ersten und zweiten  $\beta$ -Stranges (H20, Y28, Y30) der WW-Domäne wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Existenz einer zweiten Prolin-Bindungsstelle gezeigt (Abbildung 42 C). Im Hinblick auf die hohe Konservierung aromatischer Aminosäuren an den Positionen 28 und 30 innerhalb der WW-Domänen-Klassen II und III, liegt die Vermutung nahe, daß die zusätzliche Prolin-Bindungsstelle ein generelles Merkmal dieser Klassen darstellt. Darauf beruht vermutlich die Eigenschaft einiger Vertreter dieser Klassen, ebenfalls reine Polyprolin-Sequenzen binden zu können (Kato et al., 2004).

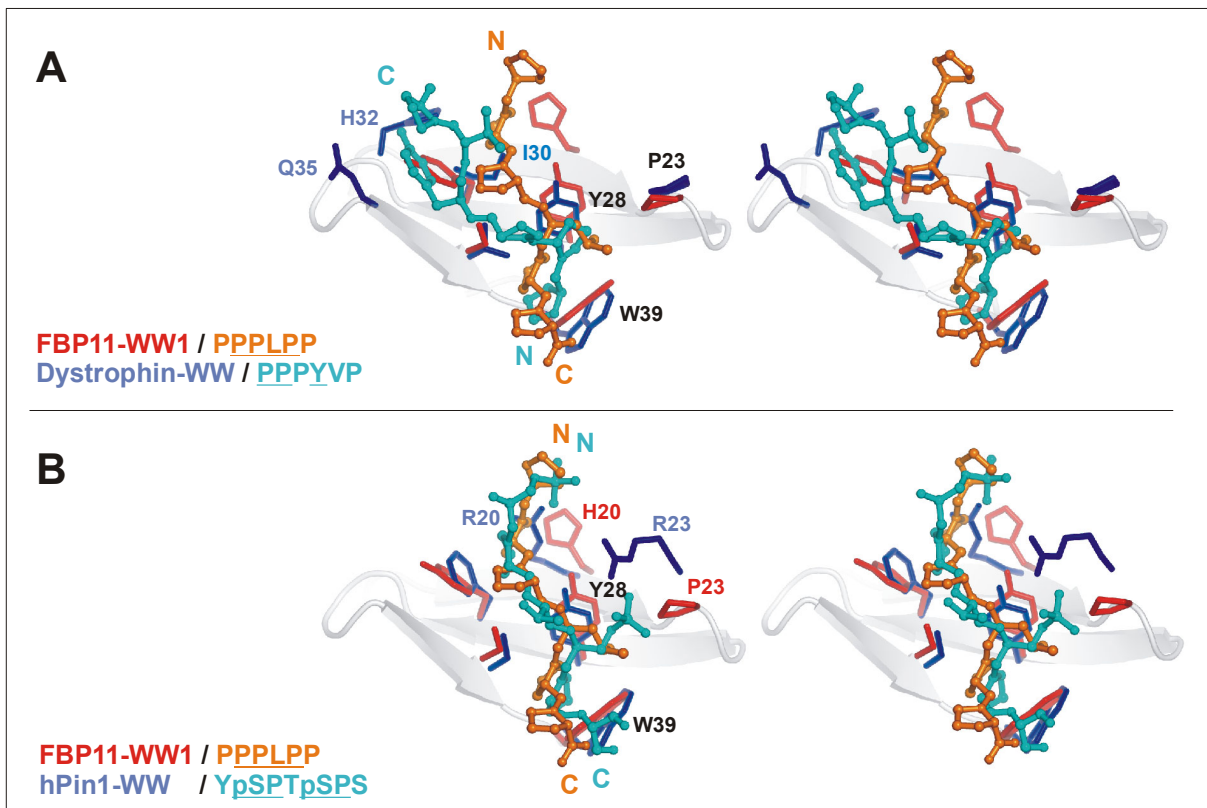
Vergleicht man die Strukturen von FBP11-WW1 und anderen WW-Domänen anhand des Verlaufs ihrer Peptidrückgrate, so wird zunächst die große Ähnlichkeit ihrer prinzipiellen Faltungstopologie deutlich (Abbildung 66). Genauer betrachtet, differieren die Strukturen jedoch in einigen Details, insbesondere in Abwesenheit der Liganden. So unterscheiden sich die freien WW-Domänen Dystrophin-WW (Klasse I), hPin1-WW (Klasse IV), FBP28-WW (Klasse II) und FBP11-WW1 (Klasse II) hauptsächlich in der Region von Loop 1 (Abbildung 66 A). Die größte Abweichung zeigt hPin1-WW, dessen Loop 1 um eine Aminosäure verlängert ist im Vergleich zu den übrigen WW-Domänen. Interessanterweise zeigt der Verlauf dieses Loops auch in FBP28-WW größere Abweichungen zu FBP11-WW1 als zu Dystrophin-WW, das einer anderen Klasse zugeordnet wird (Huang et al., 2000).



**Abbildung 66:** Strukturelle Überlagerung der Peptidrückgrate (Aminosäurepositionen 16 bis 42) von FBP11-WW1 (rot), hPin1-WW (blau, PDB-ID: 1F8A), Dystrophin-WW (grün, PDB-ID: 1EG3/1EG4) und FBP28-WW (gelb, PDB-ID: 1E0I) **(A)** in Abwesenheit von Liganden und **(B)** im Komplex mit den zugehörigen Liganden, die selbst nicht gezeigt sind. Von FBP28-WW ist keine Komplexstruktur bekannt.

Das Prolin P23 in Loop 1 von FBP11-WW1 ist auffallend weiter in Richtung der aromatischen Aminosäuren des  $\beta$ -Faltblattes verschoben, als es bei FBP28-WW der Fall ist (vgl. Abbildung 43). Hintergrund dieses Verhaltens könnte der Ausschluß von Wassermolekülen von der relativ hydrophoben Bindungsfläche von FBP11-WW1 sein, den FBP28-WW mit Alanin an dieser Stelle in Loop 1 offensichtlich nicht vollzieht. Möglicherweise steht dieser Unterschied im Zusammenhang mit der für FBP28-WW beschriebenen Tendenz, unter bestimmten Bedingungen Fibrillen auszubilden, die für FBP11-WW1 im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet wurden (Ferguson et al., 2003).

Die Bindung des prolinreichen Liganden ging mit einer auffallenden Angleichung der Struktur des Peptidrückgrates der WW-Domänen einher. Ursache dafür war eine strukturelle Änderung in Loop 1 von FBP11-WW1 und hPin1-WW infolge der Ligandenbindung, was für Dystrophin-WW dagegen kaum feststellbar war (Abbildung 66 B). Eine Erklärung dafür ergibt sich u.a. aus der in dieser Arbeit bestimmten NMR-Struktur von FBP11-WW1 im Komplex mit dem Liganden APPTPPPLPP. Darin zeigt sich, daß der Leucin-Rest (L8') des Liganden in räumlicher Nähe zu den Resten W39 und Y28 des  $\beta$ -Faltblattes, als auch zu Aminosäuren in Loop 1 (S22, P23) steht (Abbildung 42). Es wird vermutet, daß die genannten Aminosäuren von FBP11-WW1 eine annähernd komplementäre Bindungstasche bilden, in der ausschließlich Leucin optimal Platz findet. Auffallend sind die Parallelen der Ligandenerkennung zwischen FBP11-WW1 und der WW-Domäne von hPin1 (Klasse IV). Pin1-WW bewerkstelligt die spezifische Erkennung prolinhaltiger Liganden, die phosphorylierte Serin- und Threoninreste enthalten, durch die ionischen Wechselwirkungen von zwei Argininen (R20, R23) zu den Phosphatgruppen des Liganden (Verdecia et al., 2000). Arginin R23 von hPin1-WW und P23 von FBP11-WW1 befinden sich dabei an identischen Positionen. Auch die Orientierung der Liganden stimmt in den Komplexen von FBP11-WW1 und hPin1-WW überein (Abbildung 67 B).



**Abbildung 67:** Stereoabbildungen der strukturellen Überlagerung von prolinreichen Liganden im Komplex mit WW-Domänen der Klassen I und IV. **(A)** Vergleich der Orientierung des Liganden im Dystrophin-WW/Dystroglycan-Komplex (blau/hellblau, PDB-ID: 1EG4) mit dem FBP11-WW1/PPN4-Komplex (rot/orange). Spezifitätsvermittelnde Aminosäuren von Dystrophin-WW sind blau, konservierte Reste sind schwarz beschriftet. **(B)** Vergleich der Ligandenorientierung des Komplexes von hPin1-WW (blau, PDB-ID: 1F8A) und einem Phosphoserin-Prolinliganden (hellblau) mit dem FBP11-WW1/PPN4-Komplex (rot/orange). Die spezifitätsvermittelnden Reste von hPin1-WW und FBP11-WW1 sind in den entsprechenden Farben beschriftet, konservierte Aminosäuren sind schwarz gekennzeichnet. Die unterstrichenen Aminosäuren in der Sequenz der Liganden repräsentieren das Konsensus-Motiv der jeweiligen Klasse.

Die spezifische Bindung von Liganden durch WW-Domänen der Klasse I (PPxY-Motiv) beruht dagegen nicht auf Aminosäuren in Loop 1 der WW-Domäne, sondern wird durch konservierte Reste in Loop 2 (H32, Q35) sowie einem hydrophoben Rest an Position 30 vermittelt, die gemeinsam eine Bindungstasche für das Tyrosin des Liganden bilden (Macias et al., 1996). Diese bestimmt auch die Orientierung des Liganden in Komplexen von WW-Domänen dieser Klasse, die umgekehrt zu der des Liganden in FBP11-WW1 ist (Abbildung 67 A, Huang et al., 2000; Pires et al., 2001; Kanelis et al., 2001).

In dieser Arbeit stellte sich heraus, daß lediglich 5 Aminosäuren des Liganden (PPLPP) mit der Bindungsoberfläche der WW-Domäne in Kontakt treten, während die übrigen Aminosäuren des Liganden lösungsmittel-exponiert blieben. Die Möglichkeit, Liganden in zwei verschiedenen Orientierung binden zu können, resultiert aus der zweifachen Rotationssymmetrie prolinreicher Liganden, die in Polyprolin-II-Helix-Konformation vorliegen (Abbildung 39, Zarrinpar & Lim, 2000). Allerdings sind bisher keine Strukturen von Komplexen beschrieben, in denen WW-Domänen eine Ligandenbindung in beiden Orientierungen zeigen, wie es z.B. für die Bindung von SH3-Domänen an prolinreiche Liganden bekannt ist (Lim et al., 1994b). Ungeachtet der begrenzten Anzahl intermolekularer NOE-Signale zwischen FBP11-WW1 und dem Liganden konnte seine Orientierung eindeutig bestimmt werden, allerdings ist für andere Liganden auch eine entgegengesetzte Orientierung des symmetrischen PPLP(P)-Motivs denkbar. Im zellulären Kontext kann diese Flexibilität in den Bindungseigenschaften durchaus von Vorteil sein, da auf

diese Weise das Netzwerk von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit den vorhandenen Komponenten vielseitiger gestaltet werden kann. So ist es denkbar, daß FBP11 im Zuge seiner Vermittlerfunktion beim Spleißprozeß verschiedene prolinreiche Interaktionspartner über seine WW-Domänen binden kann, um ggf. variable Anordnungen von Protein-Komplexen bilden zu können (Abovich & Rosbash, 1997; Kay et al., 2000).

Für den Fall, daß die flankierenden Aminosäuren des Liganden dessen Orientierung determinieren, hätte das direkte Konsequenzen auf ein strukturbasiertes Design von Cystein-Varianten der WW-Domäne und des prolinreichen Liganden in Bezug auf das in dieser Arbeit beschriebene kovalente Kopplungssystem. Um eine Disulfidverbrückung des gebundenen Liganden zur WW-Domäne zu erreichen, sollten sich die jeweiligen Cysteine in räumlicher Nähe befinden (Abstand der  $C_{\alpha}$ -Atome: 5-6 Å, Thornton, 1981). Da die erstellten FBP11-WW1-Varianten WW-D24C und WW-K35C die Cysteine in Loop 1 bzw. Loop 2 enthalten, scheinen sich unter Annahme der Orientierung des Liganden, wie er im Komplex von WW-ASKM und PPN4 beobachtet wurde, Bindung und Disulfidverbrückung zunächst gegenseitig auszuschließen, da die Helix-Achse des Liganden genau zwischen den Cysteinpositionen in zu großem Abstand ( $\sim 10$  Å) verläuft (Abbildung 44). Abhilfe kann hier die Einführung von N- oder C-terminalen Linkersequenzen im Liganden schaffen, die den Abstand zwischen Cystein und PPLP-Motiv vergrößern und gleichzeitig Flexibilität vermitteln (Abschnitt IV.2.2).

Erst die strukturelle Aufklärung weiterer Komplexe von WW-Domänen mit prolinreichen Liganden wird es ermöglichen, den Einfluß unterschiedlicher Liganden auf die Topologie der Bindung und damit die zahlreichen *in vivo*-Interaktionen dieser Proteinwechselwirkungsdomäne genauer zu verstehen. So wird derzeit beispielsweise die Bestimmung der NMR-Struktur von FBP11-WW1 im Komplex mit dem Liganden LIPPPPPL angestrebt, die weiteren Einblick in die Bindung von Polyprolinsequenzen durch WW-Domänen der Klasse II liefern soll (R. Pires, persönliche Mitteilung).

## IV.2. Kovalent stabilisierte Assoziation vermittelt durch WW-Domänen

Der Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines kovalenten Kopplungssystems, das auf der Basis der Affinität von WW-Domänen zu prolinreichen Liganden, eine stabile Assoziation von Proteinen ermöglicht, in dem die Bindung (Heterodimerisierung) von geeigneten Fusionsproteinen beider Komponenten durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird. Analog kann der Ansatz aber auch als affinitätsvermittelte Ausbildung einer spezifischen Disulfidbrücke zwischen heterologen Proteinen bezeichnet werden. Im Folgenden sollen einige Aspekte der Anwendung von FBP11-WW1 sowie geeigneter prolinreicher Liganden als ein derartiges Kopplungssystem diskutiert werden

### IV.2.1. FBP11-WW1 und prolinreiche Sequenzen als Heterodimerisierungsmotiv

Die Auswahl von FBP11-WW1 als spezifisches Bindemodul zur Assoziation von Proteinen geht auf Vorarbeiten zurück, in denen die Affinität von WW-Domänen zu prolinreichen Sequenzen genutzt werden sollte, um Proteine an virusähnliche Kapside bestehend aus dem Hüllprotein VP1 des murinen Polyomavirus zu binden, an das zuvor die WW-Domäne FBP11-WW1 fusioniert wurde (Schmidt et al., 2001; Günther et al., 2001). So waren wesentliche Auswahlkriterien für FBP11-WW1 die geringe Größe sowie die hohe Spezifität und Affinität zu prolinreichen Liganden, die für FBP11-WW1 ursprünglich mit nanomolaren Dissoziationskonstanten beschrieben wurde (Bedford et al., 1997). Wie bereits erwähnt, resultierten diese scheinbar hohen Affinitäten aus der Verwendung von oligomeren Fusionsproteinen (GST-WW, VP1-WW) der WW-Domäne, die aufgrund ihrer Avidität in kinetischen Messungen der Oberflächenplasmonresonanz apparente Dissoziationskonstanten

aufweisen, die mehrere Größenordnungen zu klein sein können (Ladbury et al., 1995; Müller et al., 1998b). Wie sich im Verlauf der vorliegenden Arbeit jedoch herausstellte, liegt die Dissoziationskonstante der monomeren WW-Domäne FBP11-WW1 klar im mikromolaren Bereich (Abschnitte III.1.5.2 und IV.1.2). Die deutliche geringere Affinität erklärt wahrscheinlich auch die auffallend hohe Dissoziationsrate der anhand von WW-Domänen an VP1-Kapside gebundenen Polyprolin-haltigen Proteine (Schmidt et al., 2001). Ob sich diese vergleichsweise geringe Affinität als Nachteil für die Anwendung von FBP11-WW1 als Heterodimerisierungsmotiv auswirkt, ist durchaus diskussionswürdig. In Bezug auf Adressierungs- und Transportproblematiken möglicher therapeutischer Anwendungen ist oftmals eine erhöhte Stabilität der Assoziate im humanen Serum und extrazellulären Raum erwünscht. Dagegen sollte an einem intrazellulären Wirkort idealerweise eine Separation von Vehikel und therapeutischer Substanz erfolgen, wobei eine hochaffine Wechselwirkung zwischen beiden Komponenten ggf. von Nachteil sein würde. Die Assoziation der entsprechenden Komponenten allein durch die Bindung von WW-Domänen und prolinreichen Liganden kann naturgemäß nur von transientem Charakter sein, der durch die schnelle Dissoziation des (nicht-kovalenten) Komplexes bestimmt wird (Schmidt et al., 2001; Kato et al., 2004). Geeigneter erscheint für diesen Fall eine redoxabhängig modulierte Affinität, wie sie der disulfidverbrückte Komplex von WW-Domäne und prolinreichem Ligand darstellt. Dieser weist unter nicht oder nur schwach-reduzierenden Bedingungen (z.B. extrazellulärer Raum) eine deutlich höhere Stabilität auf, als unter reduzierenden Bedingungen (Cytoplasma), die eine Dissoziation des Komplexes ermöglichen (Jones et al., 2000, vgl. Abschnitt III.3.4.3).

Vor diesem Hintergrund stellten sich einige vorteilhafte Eigenschaften von FBP11-WW1 heraus, die diese Domäne für eine biotechnologische Anwendung als geeignet erscheinen ließen. So konnten generell alle GST-Fusionen der WW-Domäne, die im Verlauf dieser Arbeit hergestellt wurden, mit guten Ausbeuten rekombinant in *E.coli* überexprimiert und aus dem löslichen Zellüberstand gereinigt werden. Auch im Kontext anderer Fusionen mit der WW-Domäne (VP1, GFP) wurden gute Expressionseigenschaften von FBP11-WW1 beschrieben (Schmidt et al., 2001; Günther et al., 2001). Die verschiedenen Fusionen von Polyprolinsequenzen an GFP zeigten mit dem in dieser Arbeit verwendeten Expressionssystem (I7) keinen wesentlichen Einfluß auf die sehr gute Expression von Wildtyp-GFP in löslicher Form. Sie veranschaulichten, daß Proteine in Gegenwart einer N- oder C-terminalen Polyprolinsequenz (P<sub>8</sub>LPP) durch rekombinante Herstellung in hohen Mengen verfügbar gemacht werden können, wobei die repetitive Prolin-Sequenz die Expression nicht zu limitieren scheint (vgl. Abschnitt III.3.5.1). Die Herstellung rekombinanter Polyprolin-Fusionen ist auch in Form von unlöslichen *inclusion bodies* und nachfolgender Renaturierung möglich und führte am Beispiel der C-terminalen Fusion einer prolinreichen Sequenz an die isolierte N-terminale Domäne von CD4 zu Ausbeuten, die vergleichbar mit denen des Wildtyp-CD4-Fragmentes waren (Christiane Jäger, persönliche Mitteilung). Weitere Fusionen von heterologen Proteinen mit der WW-Domäne bzw. Polyprolinsequenzen werden zeigen müssen, ob eine Allgemeingültigkeit dieser Beobachtungen gegeben ist.

Ein weiterer Aspekt bei der rekombinanten Herstellung dieser Fusionsproteine ist die Stabilität der Konstrukte gegenüber proteolytischem Abbau durch endogene Proteasen, sowohl im Cytosol von *E.coli* als auch *in vitro* während der Aufarbeitung des bakteriellen Zellextraktes. So erfolgte die Expression von GST-WW zwar über einen relativ langen Zeitraum (7h ab Induktion, 37°C), ein Abbau durch Proteasen war jedoch nicht sichtbar. Ein ähnliches Verhalten zeigte die Polyprolin-Fusion von GFP, die ebenfalls in Abwesenheit von proteolytischen Abbaufragmenten bis zur Homogenität gereinigt werden konnte. Mit Sicherheit leisten genetisch modifizierte Expressionsstämme von *E.coli* (z.B. BL21 DE3) dazu einen wesentlichen Beitrag, deren Defizienz für bestimmte endogene Proteasen die Stabilität rekombinant exprimierter Proteine

erhöhen kann (Abschnitt II.3). Ebenso ist der Einfluß aminoterminaler Reste auf die intrazelluläre Halbwertszeit von Proteinen in Pro- und Eukaryonten von Bedeutung. Dabei wirken sich Prolin-Reste (ebenso wie Cys, Gly, Ser und Ala) stabilisierend aus, während beispielsweise die geladenen Reste Lysin und Arginin einen destabilisierenden Einfluß haben (*N-end rule*, Tobias et al., 1991).

#### IV.2.2. Strukturelle Aspekte der artifiziellen Disulfidbrücke

Im Kontext der für die Disulfidverbrückung notwendigen Mutation des cysteinfreien Wildtypes von FBP11-WW1 waren anhand des zur Verfügung stehenden Strukturmodells die Aminosäuren D24 und K35 ausgewählt worden. In Übereinstimmung von Modell und später experimentell bestimmter Struktur von FBP11-WW1, befanden sich beide Reste in Loop-Regionen der WW-Domäne (Abbildung 44). Die Auswahl dieser Positionen beruhte auf der Prämisse, die Polyprolinbindung möglichst wenig zu beeinträchtigen, die im Wesentlichen von Aminosäuren des  $\beta$ -Faltblattes vermittelt wird. Für WW-Domänen der Klassen I und IV war jedoch bekannt, daß die Spezifität der Bindung durch geladene Aminosäuren in Loop 1 bzw. Loop 2 determiniert wird (Macias et al., 1996; Zarrinpar & Lim, 2000). Mangels Verfügbarkeit struktureller Informationen von Komplexen der Klasse II, beruhte das rationale Design der Mutanten auf Analysen der Sequenzidentität bzw. -homologie von FBP11-WW1 zu anderen WW-Domänen dieser Kategorie (Abbildung 4). Zusätzlich wurde vermutet, daß die geladenen Reste D24 und K35 nicht wesentlich in die Bindung des unpolaren PPLP-Liganden involviert sind. Bindungsanalysen der Varianten WW-D24C und WW-K35C bestätigten die nahezu unveränderten Bindungseigenschaften im Vergleich zum Wildtyp (Abschnitt III.3.2.2).

In Experimenten zur kovalenten Kopplung durch Disulfidverbrückung der beiden Varianten mit verschiedenen cysteinhaltigen, prolinreichen Liganden, zeichnete sich jedoch ein unterschiedliches Verhalten ab. Die Verbrückung vermittelt durch Luftsauerstoff führte im Fall von WW-D24C zu signifikanter Homodimerisierung der WW-Domäne verbunden mit einer geringen Komplexausbeute. Dagegen zeigte WW-K35C kaum Tendenzen zur Homodimerisierung und koppelte nahezu quantitativ an die jeweiligen Liganden, unter Bildung des disulfidverbrückten Komplexes (vgl. Abschnitt III.3.4.6). Noch deutlicher wurde dieses unterschiedliche Verhalten in Gegenwart eines Redoxsystems, basierend auf oxidiertem und reduzierten Glutathion. Dabei ging die Kopplungsreaktion mit einer Gleichgewichtseinstellung einher und konnte somit unter verschiedenen Redoxbedingungen quantitativ analysiert werden. Im Gegensatz zu WW-D24C konnte für mehrere kovalente Komplexe von WW-K35C mit prolinreichen Liganden eine Stabilisierung der Disulfidbrücke zwischen beiden Komponenten nachgewiesen werden. Diese äußerte sich in der Population der heterodimeren Spezies unter Redoxbedingungen, die im Fall nicht-stabilisierter Disulfide (z.B. mit Glutathion) bereits zur vollständigen Reduktion führten (vgl. Abschnitt III.3.4.3).

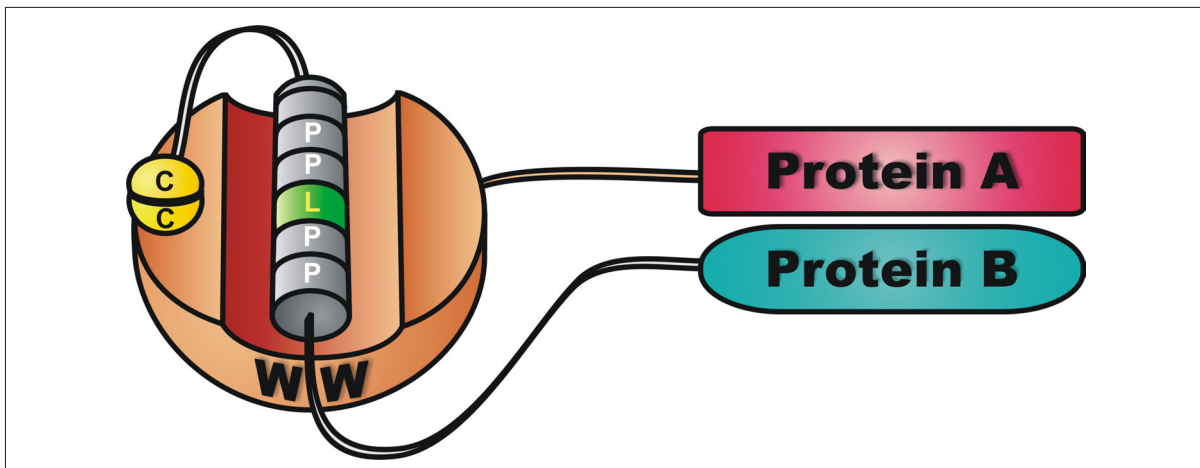
Wie läßt sich das unterschiedliche Verhalten von WW-D24C und WW-K35C erklären? Die funktionelle und strukturelle Charakterisierung der beiden Varianten hatte zunächst gezeigt, daß beide Varianten unter den üblichen Bedingungen (25°C, pH 6-8) die charakteristische WW-Domänen-Faltung aufweisen und prolinreiche Liganden mit zum Wildtyp vergleichbarer Affinität binden können. Offensichtlich ist die Position des Cysteins in WW-D24C jedoch sterisch ungünstiger für die Ausbildung einer Disulfidbrücke zu bestimmten Liganden als in WW-K35C. Die strukturelle Aufklärung des Komplexes der cysteinfreien Varianten von FBP11-WW1 und Ligand hatte gezeigt, daß mehrere Reste in Loop 1 (S22, P23) an der spezifischen Bindung des Liganden beteiligt sind. Da sich Cystein C24 der Variante WW-D24C in unmittelbarer Nachbarschaft zu diesen Aminosäuren befindet, wird vermutet, daß sich Ligandenbindung und Disulfidverbrückung an dieser Position gegenseitig ausschließen. In diesem Fall würde sich bei

der Kopplung vermittelt durch Luftsauerstoff die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Homodimeren erhöhen, in Gegenwart des Redoxsystems dagegen zur Akkumulation der Komponenten in Form ihrer gemischten Disulfide mit den Redoxsubstanzen des Puffers führen. Dieses Verhalten wurde z.B. für die Kopplung von WW-D24C und PPC2 sowie PPC4 beobachtet, während andere Liganden (PPC7 und PPC10) zwar in Gegenwart von Luftsauerstoff quantitativ mit WW-D24C disulfidverbrückt werden konnten, deren Komplexe allerdings keine signifikante Stabilisierung unter definierten Redoxbedingungen zeigten. <sup>1</sup>H-NMR-Analysen dieser Kopplungsprodukte ergaben, daß die mit WW-D24C disulfidverbrückten Liganden offensichtlich nicht in der konservierten Prolinbindungstasche der WW-Domäne (W39, Y28) gebunden vorlagen.

Die Variante WW-K35C zeigte dagegen ein etwas anderes Verhalten bei der Disulfidverbrückung mit verschiedenen prolinreichen Liganden. So führte die oxidative Kopplung in Gegenwart von Luftsauerstoff in allen Fällen zu einer nahezu quantitativen Komplexbildung ohne signifikante Akkumulation der homodimerisierten WW-Domäne (vgl. Abschnitt III.3.4.6). Die Eignung der verschiedenen Liganden konnte in Gegenwart des Glutathion-Redoxsystems noch besser untersucht werden. Für einige der Liganden (PPC1, PPC2, PPC3 sowie PPC10) wurde eine deutliche Stabilisierung ihrer disulfidverbrückten Komplexe mit WW-K35C unter stärker reduzierenden Bedingungen nachgewiesen. Es fiel auf, daß die Ausbildung eines stabilen Komplexes an einen gewissen Abstand zwischen Cystein und PPLP-Motiv im Liganden gebunden war und das Ausmaß der Stabilisierung mit der Länge des dazu verwendeten Glycin/Serin-Linkers korrelierte (vgl. Abschnitt III.3.4.3). Die <sup>1</sup>H-NMR-Analyse ausgewählter Komplexe von WW-K35C mit prolinreichen Liganden ließ vermuten, daß lediglich Liganden mit einem flexiblen Linker (z.B. PPC2) auch im disulfidverbrückten Komplex noch in der Bindungstasche (W39) der WW-Domäne liegen und dadurch einen stabilisierenden Einfluß auf die Disulfidbrücke ausüben. Andere Liganden, deren Cystein in bzw. nahe der helixbildenden Polyprolinsequenz lag, konnten die Disulfidbrücke des Komplexes dagegen kaum stabilisieren (z.B. PPC4, PPC5, PPC6). Auch die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren dieser Komplexe wiesen darauf hin, daß sich die gekoppelten Liganden nicht mehr in der ursprünglichen Position in der Prolinbindungsstelle der WW-Domäne (W39) befanden.

Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente können folgende wesentliche Erfordernisse für eine stabile Disulfidverbrückung von FBP11-WW1 mit einem prolinreichen Liganden festgehalten werden: Bei Positionierung der Cysteine in Loopregionen der WW-Domäne ist Loop 2 vorzuziehen. Zudem vermittelt ein ausreichend dimensionierter Linker (Glycin/Serin) zwischen Polyprolinmotiv und Cystein des Liganden den notwendigen Abstand sowie Flexibilität, um gleichzeitig Bindung und Kopplung des Liganden zuzulassen. Im Hinblick auf die Anwendung des Systems, wäre z.B. die FBP11-WW1-Variante WW-K35C zusammen mit den prolinreichen Liganden PPC1 (auch PPC2/PPC3) einsetzbar, um nach Herstellung davon abgeleiteter Fusionsproteine eine kovalente Assoziation von Proteinen zu bewerkstelligen (Abbildung 68).





**Abbildung 68:** Schematische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit realisierten kovalenten Assoziation von Proteinen vermittelt durch den disulfidverbrückten Komplex von WW-Domäne (in Fusion mit Protein A) und einem prolinreichen Liganden (fusioniert an Protein B). Der Zylinder repräsentiert die Polyprolin-II-Helix des prolinreichen Liganden, der an die Bindungsfläche der WW-Domäne bindet. Das Cystein des Liganden befindet sich im gewissen Abstand zum PPLP(P)-Motiv und bildet eine Disulfidbrücke mit dem Cystein der WW-Domäne aus, das ebenfalls von der Prolin-Bindungsstelle entfernt liegt (z.B. GST-WW-K35C und C-PP-GFP).

Der offensichtlich notwendige Abstand zwischen Cystein und Polyprolinsequenz des Liganden scheint dabei eine direkte Konsequenz der Positionierung von Cystein C35 in Loop 2 von WW-K35C zu sein. Da dieser Aminosäurerest nicht in direkter Nachbarschaft zu den Prolinbindestellen der WW-Domäne liegt, wird verständlich, daß einerseits mehrere Aminosäuren (in Form des Glycin/Serin-Linkers) zur Überbrückung des Abstandes notwendig sind, um eine Bindung des Liganden im kovalent gekoppelten Zustand zu ermöglichen (vgl. Abbildung 44 C).

Andererseits erfordert die Ausbildung einer Disulfidbrücke eine strikt definierte Geometrie der beteiligten Cysteine. Eine optimale Disulfidbrücke weist einen Abstand der beiden Schwefelatome von etwa 2 Å auf, die Winkel zwischen dem Sulfid und den  $\beta$ -Kohlenstoff-Atomen der beiden Cysteine sollten nahe bei  $103^\circ$  liegen, während die Dihedralwinkel um das Disulfid entweder  $+90^\circ$  oder  $-90^\circ$  betragen (rechtshändige bzw. linkshändige Disulfidbrücke, Creighton, 1988). Eine Disulfidverbrückung unter Abweichung von dieser Geometrie resultiert in sterischen Spannungen, die eine Ausbildung dieser Bindung weniger begünstigen und im Fall von intramolekularen Disulfidbrücken oft zu einer Destabilisierung des Proteins führen. Am Beispiel von T4-Lysozym wurde gezeigt, daß artifizielle Disulfidbrücken insbesondere dann eine stabilisierende Wirkung haben, wenn sie in flexiblen Regionen des Proteins eingeführt wurden. Dagegen wirkte sich das Design von Disulfidbrücken in weniger flexiblen Regionen, wie z.B. innerhalb von Sekundärstrukturelementen, destabilisierend aus (Matsumura & Matthews, 1991; Matsumura et al., 1989). Dennoch ist die Einführung stabilisierender Disulfidbrücken in rigiden Bereichen von Proteinen möglich, wie es beispielsweise am Beispiel von amphiphilen  $\alpha$ -Helices (*coiled coils*) gezeigt wurde. Unter optimaler Ausrichtung von zwei intra-helikalen Cysteinen führte die intermolekulare Disulfidbrücke zu einer signifikanten Stabilisierung des *coiled coil*-Komplexes (Zhou et al., 1993).

Im Fall des disulfidverbrückten Komplexes von WW-Domäne und Ligand führte dagegen nur die Strategie der Einbeziehung eines flexiblen Linkers zu einer stabilen Disulfidverbrückung, da die konformationell sehr eingeschränkte Polyprolin-II-Helix-Konformation des Liganden offensichtlich keine optimale Positionierung des Cysteins bzgl. C35 der WW-Domäne erlaubt.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob sich anhand von alternativen Cystein-Varianten der WW-Domäne, deren Cystein näher an der Bindungsstelle des Liganden liegt,



weitere Liganden finden ließen, die eine stabile Disulfidbrücke ohne den erwähnten Linker bewerkstelligen könnten. Unter Annahme einer gleichbleibenden Orientierung des gebundenen Liganden kommen dafür - bedingt durch die geringe Größe der WW-Domäne - jedoch nur sehr wenige Aminosäuren in Frage, die nicht auf der Rückseite des  $\beta$ -Faltblattes liegen. Unter Vermeidung von Substitutionen in Loop 1 sowie dem Erhalt von Aminosäuren, die wesentlich an der Bindung des prolinreichen Liganden beteiligt sind (H20, Y28, Y30, S37, W39), verbleiben lediglich die Reste Methionin M16 und Threonin T18, wobei letzterer zwar in gewissem Umfang an der Ausbildung der zweiten Prolinbindungsstelle beteiligt ist, jedoch innerhalb der WW-Domänen-Klasse II nicht sehr konserviert ist (vgl. Abbildung 4 und Abbildung 42 C). Eine Alternative zu Lysin K35 in Loop 2 würde noch die Position von Threonin T32 darstellen, das sich ebenfalls in Loop 2 befindet und nicht konserviert ist, dementsprechend allerdings auch eine ähnliche Entfernung zur Prolin-Bindungsstelle aufweist.

Für die hYAP-WW-Domäne (Klasse I) wurde eine ähnliche, systematische Substitutionsanalyse unter Verwendung der Spot-Technologie beschrieben (Toepert et al., 2001). Dazu wurde eine Bibliothek von Einzelaustausch-Varianten auf einer Cellulosemembran synthetisiert, bei der jede der 43 Aminosäuren von hYAP-WW sukzessive durch eine der 20 proteinogenen Aminosäuren ausgetauscht wurde. Darin bestätigte sich, daß sowohl die zentralen Aminosäuren des  $\beta$ -Faltblattes, als auch spezifitätsvermittelnde Reste in Loopregionen für die Ligandenbindung essentiell sind und nicht ersetzt werden dürfen. An den übrigen Positionen der Loopbereiche sowie am N- und C-Terminus zeigte sich hYAP-WW bezüglich der Bindung dagegen deutlich toleranter gegenüber Mutationen, wobei in den meisten Fällen Cystein ebenso gut wie andere Aminosäuren akzeptiert wurde.

Die WW-Domäne stellt aufgrund ihrer kompakten und gut charakterisierten Struktur ein attraktives Ziel für Proteindesign-Studien dar. Dabei zeigte sich, daß die WW-Domäne trotz ihrer geringen Größe an zahlreichen Positionen modifiziert werden kann, ohne Stabilität und Struktur der Domäne einzubüßen (Macias et al., 2000; Jiang et al., 2001; Kraemer-Pecore et al., 2003; Santiveri et al., 2004). Muß jedoch auch der Erhalt der Bindungseigenschaften berücksichtigt werden, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall war, so sind die Möglichkeiten des Protein-Designs wesentlich eingeschränkter. Den Erkenntnissen dieser Arbeit zufolge kommen für die Einführung von Cysteinen auf der Bindungsoberfläche von FBP11-WW1 nur Aminosäurepositionen in Frage, die keinen wesentlichen Anteil an Affinität und Spezifität der Bindung von prolinreichen Liganden mit dem PPLP-Motiv haben.

### IV.2.3. Einfluß des Oxidationsverfahrens auf Effizienz und Spezifität der Kopplung

Die Disulfidverbrückung von WW-Domäne und prolinreichem Ligand stellt eine Oxidationsreaktion dar und ist mit der Übertragung von zwei Elektronen auf einen geeigneten Elektronenakzeptor verbunden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Kopplung sowohl in Gegenwart von Sauerstoff als Akzeptor als auch unter Verwendung des Glutathion-Redoxsystems, bei dem oxidiertes Glutathion (GSSG) die Elektronen von WW-Domäne und Ligand übernimmt und dabei selbst zu GSH reduziert wird. Während die durch Luftsauerstoff vermittelte Oxidation einen langsamen und schlecht kontrollierbaren Vorgang darstellt, lassen sich anhand der Konzentrationen von GSSG und GSH im Kopplungsansatz definierte Redoxbedingungen einstellen, die eine Ausbildung von Disulfidbrücken unter reproduzierbaren Bedingungen gestatten (Wetlaufer et al., 1977). Im Gegensatz zur Oxidation von Thiolgruppen vermittelt durch molekularen Sauerstoff, ist der Mechanismus der Disulfidverbrückung im Zuge eines Thiol-Disulfid-Austausches mit dem Glutathion-Redoxsystem gut verstanden. Infolge des nucleophilen Angriffes eines Thiolat-Anions, das durch Deprotonierung einer Thiolgruppe entsteht, auf ein Disulfid, kommt es zu einer Austauschreaktion, bei der ein Schwefelatom einer

existierenden Disulfidbrücke durch das Schwefelatom des Thiolat-Anions ersetzt wird (Gilbert, 1990). Die Reaktivität der Thiolgruppe wird dabei durch ihren  $pK_a$ -Wert bestimmt, der ihre Tendenz zur Deprotonierung widerspiegelt. Aus dem  $pK_a$ -Wert von Cysteinen in Peptiden und Proteinen, der zwischen 8 und 9 liegt, ergibt sich, daß der Thiol-Disulfid-Austausch am effektivsten unter basischen Bedingungen ( $pH > 8$ ) abläuft. Diese pH-Abhängigkeit gilt auch für die Oxidation von Cysteinen durch Luftsauerstoff (Jocelyn, 1972; Ahmed et al., 1975).

In der Analyse der Bindungseigenschaften von FBP11-WW1 an prolinreiche Liganden hatte sich eine pH-Abhängigkeit der Dissoziationskonstante gezeigt, die sich in der höchsten Affinität bei pH 8 äußerte und auf eine Involvierung von Histidin H20 bei der Ligandenbindung hinwies (Abschnitt III.1.5.3). Bei pH-Werten  $>8$  nahm die Affinität hingegen wieder ab, was vermutlich auf eine Destabilisierung der WW-Domäne unter diesen Bedingungen hinwies. Unter zusätzlicher Berücksichtigung des Einflusses der Ionenstärke auf die Bindung (Abschnitt III.1.5.5) wurden für die Kopplungsreaktionen daher stets Bedingungen gewählt, unter denen die WW-Domäne eine möglichst hohe Affinität zum Ligand zeigte und gleichzeitig die Reaktivität der Cystein-Thiolgruppen gewährleistet war ('WW-Puffer TB/HB': pH 8.0, 500 mM NaCl).

Eine Disulfidverbrückung von WW-Domäne und Ligand konnte sowohl unter Verwendung eines Redoxsystems (GSSG/GSH) als auch durch Oxidation vermittelt durch Luftsauerstoff gezeigt werden. Beide Methoden weisen jedoch Vor- und Nachteile auf, die ihre Eignung im Rahmen des etablierten Kopplungsverfahrens von verschiedenen Randbedingungen abhängig machen. Die Verwendung eines Redoxsystems basierend auf GSSG/GSH führt (unter Ausschluß von Sauerstoff) stets zur Einstellung eines Gleichgewichtes, dessen Lage in Abhängigkeit von der Konzentration des Redoxsystems im Verhältnis zu WW-Domäne und Ligand, sowie den Redoxbedingungen (Verhältnis GSSG/GSH) mehr oder weniger auf der Seite des disulfidverbrückten Komplexes liegt. In dieser Arbeit wurde mit einem 40- bis 130-fachen Überschuß von Glutathion gegenüber den zu koppelnden Komponenten gearbeitet. Unter diesen Verhältnissen war unter keinen Redoxbedingungen eine quantitative Komplexbildung zu verzeichnen. Die maximalen Kopplungsausbeuten betragen unter optimalen Bedingungen etwa 55% sowohl bei der Disulfidverbrückung der isolierten WW-Domäne WW-K35C mit dem Peptidliganden PPC1 als auch bei der kovalenten Assoziation von GST-WW-K35C mit C-PP-GFP (Abschnitte III.3.4.3 und III.3.5.3).

Die unvollständige Kopplung unter stärker oxidierenden Bedingungen wurde durch das Auftreten von gemischten Disulfiden der isolierten WW-Domäne sowie des prolinreichen Peptidliganden mit Glutathion begleitet, die unter den gegebenen Bedingungen in signifikanten Konzentrationen im Gleichgewicht populiert wurden. Diese gemischten Disulfide sind als Intermediate des Thiol-Disulfid-Austausches bei der inter- bzw. intramolekulare Disulfidbrückenbildung anzusehen. In letzterem Fall (z.B. während der oxidativen Proteinfaltung *in vitro*) werden diese Zwischenprodukte jedoch nicht wesentlich angereichert, da der nachfolgende Austauschschritt mit einem (intramolekularen) Thiolat-Anion des Proteins aufgrund der hohen lokalen Cystein-Konzentration sehr schnell erfolgt. (Creighton, 1984). Die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke, die im vorliegenden Fall die Assoziation von WW-Domäne und prolinreichem Ligand stabilisieren soll, ist nach der Bildung des gemischten Disulfides der einen Komponente von der Wahrscheinlichkeit eines weiteren Thiol-Disulfid-Austausches mit dem zweiten (reduzierten) Kopplungspartner abhängig.

Beide Teilreaktionen der Kopplungsreaktion von WW-Domäne (WW) und prolinreichem Ligand (P) sind, ausgehend von der reduzierten WW-Domäne, im folgenden Schema dargestellt.



In Gegenwart des Redoxsystems (GSSG/GSH) im hohen molaren Überschuß stellte die Bildung der gemischten Disulfide mit Glutathion offensichtlich eine signifikante Konkurrenzreaktion zur Komplexbildung dar und führte dazu, daß das Gleichgewicht der eigentlichen Komplexbildungsreaktion (WWSSP) auf die Seite der gemischten Disulfide verschoben (WWSSG bzw. PSSG) wurde. Unter stärker reduzierenden Bedingungen wurde die Entstehung dieser Spezies mehr und mehr zurückgedrängt, so daß WW-Domäne und Ligand zunehmend in reduzierter Form vorlag. Dagegen stellte der kovalente Komplex beider Moleküle ein stabilisiertes Disulfid dar und blieb bis zu einem gewissen Ausmaß auch unter stärker reduzierenden Bedingungen erhalten. Würde die Kopplung in Gegenwart von niedrigeren Konzentrationen des Glutathion-Redoxsystems durchgeführt werden, so müßte sich, dem Massenwirkungsgesetz zufolge, das Gleichgewicht der Gesamtreaktion zugunsten der Komplexbildung verschieben lassen und damit die Kopplungsausbeute erhöht werden können. Simulationen unter Einbeziehung geringerer Glutathion-Konzentrationen unterstützten diese Vermutung (Daten nicht gezeigt, vgl. Abschnitt III.3.4.5).

In Untersuchungen zur Anwendung eines alternativen Kopplungsverfahrens für Proteine, das auf der Assoziation anhand von entgegengesetzt geladenen, polyionischen Aminosäuresequenzen basiert, zeigte eine ähnliche Analyse der auftretenden Spezies ein anderes Ergebnis (Richter et al., 2001). Trotz Einsatz vergleichbarer Konzentrationen der beteiligten Komponenten, erwies sich die Disulfidverbrückung der dabei untersuchten Peptide ACK<sub>8</sub> und ACE<sub>8</sub> bis zu einer Salzkonzentration von etwa 50 mM NaCl nahezu quantitativ, wobei die Konzentration der im Gleichgewicht populierte gemischten Disulfide mit Glutathion vernachlässigbar gering war. Wurde die Ionenstärke des Lösungsmittels erhöht, so verringerte sich die Kopplungsausbeute drastisch (Aufhebung der Assoziation ab etwa 400 mM NaCl) und die Peptide bildeten statt dessen gemischte Disulfide mit Glutathion. Dieses Verhalten charakterisierte einerseits den ionischen Charakter der diesem Kopplungsverfahren zugrundeliegenden Interaktion und zeigte, daß bei niedrigen Ionenstärken die Ausbildung des disulfidverbrückten Heterodimers ACK<sub>8</sub>-ACE<sub>8</sub> gegenüber der Entstehung gemischter Disulfide stärker begünstigt ist als es im hier vorgestellten Verfahren (WW/PP) der Fall ist.

Allerdings zeigte sich in der Anwendung des polyionischen Kopplungsverfahrens eine geringere Effizienz bei der kovalenten Assoziation von Proteinen in Gegenwart des Glutathion-Redoxsystems als es für die isolierten Peptide ACK<sub>8</sub> und ACE<sub>8</sub> beobachtet wurde. So konnte bei der Herstellung eines Antikörper-Enzym-Konjugates vermittelt durch polyionische Fusionspeptide unter oxidierenden Bedingungen ( $\text{GSH}^2/\text{GSSG} = 1.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) und 5-fachem Überschuß des einen Assoziationspartners (5  $\mu\text{M}$ ) eine Kopplungsausbeute von etwa 60% erreicht werden (Richter et al., 2001). Diese verringerte Effizienz wird auf partiellen proteolytischen Abbau der polyionischen Fusionsproteine zurückgeführt, die demzufolge für eine Kopplung nicht mehr zur Verfügung stehen. Für die Assoziation eines Immuntoxins nach identischem Schema wurde eine Kopplungseffizienz von bis zu 80% beschrieben, die allerdings auch mit höheren Proteinkonzentrationen ( $\sim 20 \mu\text{M}$ ) der eingesetzten Komponenten erzielt wurde (Kleinschmidt et al., 2003). Im Vergleich dazu führte die kovalente Assoziation von GST und GFP vermittelt durch WW-Domäne und Polyprolinligand unter ähnlichen

Redoxbedingungen ( $\text{GSH}^2/\text{GSSG}=1.06 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ), bei Verwendung von einem zweifachen Überschuß von GST gegenüber GFP und deutlich höheren Proteinkonzentrationen der Kopplungspartner ( $50\text{-}100 \mu\text{M}$ ) zu Kopplungsausbeuten im Bereich von 50%. Obwohl die Konzentrationsabhängigkeit dieses Wertes im Rahmen dieser Arbeit nicht eingehender untersucht wurde, scheint dem Kopplungsverfahren basierend auf WW-Domänen eine geringere Affinität im Vergleich zum polyionischen Assoziationsverfahren zugrunde zu liegen, die sich unter identischen Redoxbedingungen in einer geringeren Kopplungsausbeute äußert. Die Möglichkeit der Erhöhung des Komplexanteils im Gleichgewicht durch Verringerung der Glutathion-Konzentration wurde bereits erwähnt und könnte diesen Nachteil der Redoxsystem-vermittelten Kopplung im Hinblick auf eine Anwendung kompensieren.

Da es bei der spontanen Oxidation in Gegenwart von Sauerstoff nicht zu einer Einstellung eines Redoxgleichgewichtes kommt, ermöglicht diese Strategie zur Disulfidbrückenbildung eine quantitative Komplexbildung, die in dieser Form für die Kopplung der isolierten WW-Domäne mit prolinreichen Peptidliganden beobachtet wurde (Abschnitt III.3.4.6). Nachteil dieses Verfahrens ist einerseits die schlechte Kontrollierbarkeit dieses Prozesses, da die Einstellung einer definierten Sauerstoffkonzentration im Kopplungsansatz nicht praktikabel ist. Durch Zusatz katalytischer Mengen zweiwertigen Kupfers ( $\text{CuCl}_2$ ) kann diese Oxidation zwar beschleunigt werden (Ahmed et al., 1975), allerdings erschweren andere experimentelle Parameter ( $\text{O}_2$ -Sättigung und -eintrag im Lösungsmittel, Durchmischung und Oberflächen-Volumen-Verhältnis des Reaktionsansatzes) eine reproduzierbare Durchführung. Andererseits wurde das Entstehen von Wasserstoffperoxid und Radikalen wie das Superoxid-Anion im Verlauf von Thiol-Autooxidationen beschrieben, die ggf. weitere chemische Modifikationen des Proteins verursachen können (Misra, 1974; Costa et al., 1977).

Daneben ist auch die Spezifität der Kopplung geringer, da unspezifisch gebildete Disulfide nicht einer erneuten Reduktion und Reoxidation (*Redoxshuffling*) unterliegen, wie es in Gegenwart eines Redoxsystems der Fall ist, und damit eine irreversible Nebenreaktion darstellen. Für die Herstellung der disulfidverbrückten Komplexe der isolierten WW-Domäne mit prolinreichen Peptidliganden bietet sich diese Methode dennoch an, da diese jeweils nur ein Cystein enthalten und somit nur die Homodimerisierung der Moleküle als unerwünschte Nebenreaktion auftreten konnte.

Im Gegensatz zu polyionischen Fusionsproteinen, deren Homodimerisierung, bedingt durch die elektrostatische Abstoßung der geladenen Aminosäuresequenzen unter geringen Ionenstärken, nahezu vernachlässigbar ist (Richter et al., 2001), zeigen Cysteinvarianten der WW-Domäne und der prolinreichen Liganden durchaus eine signifikante Tendenz zu diesem Verhalten. Besonders auffällig war die rasche Homodimerisierung von Peptiden und dem Fusionsprotein C-PP-GFP, deren Cysteine gut zugänglich am N-Terminus der prolinreichen Sequenz lagen. Peptidliganden mit internen Cysteinen sowie die Cysteinvarianten der WW-Domäne zeigten eine sichtbar langsamere Homodimerisierung (vgl. Abschnitt III.3.4.6). Ein interessanter Befund ergab sich aus der Beobachtung, daß die Homodimerisierung der prolinreichen Liganden (Peptide und GFP) reversibel war. Nach Zugabe der reduzierten WW-Domäne zum oxidierten Polyprolinliganden-Dimer fand offensichtlich ein Thiol-Disulfid-Austausch unter Bildung des disulfidverbrückten Komplexes beider Komponenten statt, der durch folgendes Schema wiedergegeben wird:



Daraus ergab sich ein wesentlicher Vorteil für die Durchführung der Kopplung in Abwesenheit eines Redoxsystems, da lediglich eine der beiden Komponenten (Polyprolin-Ligand) in

Gegenwart von Luftsauerstoff (langsam) oxidiert werden mußte, während die zweite Komponente (WW-Domäne) in reduzierter Form zugegeben werden konnte und dadurch eine (schnelle) sauerstoffunabhängige Kopplung realisierbar war. Wurde das oxidierte Ligandendimer in mindestens zweifachem Überschuß eingesetzt, so konnte im Fall der Kopplung von WW-K35C mit cysteinhaltigen Peptidliganden ein nahezu quantitativer Umsatz bzgl. der WW-Domäne erreicht werden. Die Nebenreaktion ihrer Homodimerisierung war dagegen vernachlässigbar.

In den Versuchen zur kovalenten Assoziation von GST-WW und PP-GFP vermittelt durch Luftsauerstoff war jedoch trotz des Einsatzes dieses Verfahrens (oxidiertes PP-GFP-Dimer/reduziertes GST-WW) die Entstehung von höhermolekularen Oligomeren von beiden Proteinen zu verzeichnen, die sowohl in der analytischen Gelfiltration als auch im nicht-reduzierenden SDS-Gel ein deutlich größeres Molekulargewicht zeigten, als es für den GST-GFP-Komplex zu erwarten war (Abschnitt III.3.5.3). Die Ursache dafür lag in der erhöhten Neigung zur oxidativen Homooligomerisierung seitens GST-WW, das unter nativen Bedingungen *per se* ein nicht-kovalentes Dimer bildet und mehrere oberflächenexponierte freie Cysteine (einschließlich dem Cystein der WW-Domäne) aufweist (Walker et al., 1993; McTigue et al., 1995). Wahrscheinlich wurde dadurch die Bildung von unspezifisch disulfidverbrückten, höhermolekularen GST-Spezies unter oxidierenden Bedingungen begünstigt, denen das cytosolische Protein normalerweise nicht ausgesetzt ist. Eine unspezifische Kopplung von weiteren PP-GFP-Molekülen an die vier natürlichen Cysteine von GST-WW schien dagegen nicht stattzufinden. Die dabei zu erwartenden Spezies konnten weder durch analytische Gelfiltration noch in der nicht-reduzierenden SDS-PAGE nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt III.3.5.3). Unter der Voraussetzung, daß diese unspezifische Kopplung mehrerer PP-GFP-Moleküle an GST-WW nicht allein aus sterischen Gründen ausgeschlossen ist, kann diese Beobachtung als ein deutliches Zeichen für die Spezifität der WW-Domänen-vermittelten Assoziation angesehen werden. Diese ist offensichtlich auch bei der oxidativen Kopplung vermittelt durch Luftsauerstoff gegeben.

In Gegenwart eines Redoxsystems war die Kopplung von GST-WW und PP-GFP mit einer weiteren Zunahme der Spezifität verbunden, worauf die Abwesenheit der hochmolekularen, disulfidverbrückten Spezies hindeutete. Im Gleichgewicht unter definierten Redoxbedingungen war die Ausbildung der zur Oligomerisierung führenden, ungerichteten Disulfidbrücken offensichtlich nicht begünstigt, so daß die entsprechenden Spezies nicht populiert wurden. Statt dessen konnten ausschließlich Produkte der spezifischen Assoziation nachgewiesen werden, die auf der Ausbildung einer gerichteten Disulfidbrücke zwischen WW-Domäne von GST-WW und prolinreicher Sequenz von PP-GFP beruhte.

Vor dem Hintergrund der natürlichen Dimerisierung sowie dem Vorhandensein zusätzlicher Cystein-Reste stellte die kovalente Assoziation von GST-WW und PP-GFP ein durchaus anspruchsvolles Modellsystem zur Demonstration des in dieser Arbeit etablierten Kopplungsverfahrens dar. Im Hinblick auf zukünftige Anwendungen konnte festgestellt werden, daß sich durch spontane Oxidation des Polyprolin-haltigen Kopplungspartners, in Gegenwart von Sauerstoff, in Kombination mit einer Kopplungsreaktion, basierend auf einem schnellen Thiol-Disulfid-Austausch, eine quantitative Kopplung bewerkstelligen läßt. Jedoch erfordert diese Herangehensweise eine sorgfältige Optimierung der Parameter der Kopplungsreaktion (z.B. Konzentrationsverhältnisse der eingesetzten Komponenten), um unspezifische Nebenreaktionen, wie z.B. die irreversible Homooligomerisierung weitgehend zu unterbinden.

Ist dies nicht möglich, so erlaubt die Disulfidverbrückung unter Verwendung eines Glutathion-Redoxsystems die spezifische, kovalente Assoziation unter definierten Redoxbedingungen, die

Nebenreaktionen der angestrebten Kopplung reversibel gestalten und damit weitestgehend unterdrücken. Allerdings kann diese Methode, aufgrund der Lage des sich dabei einstellenden Gleichgewichtes, mit geringeren Kopplungsausbeuten sowie der Ausbildung von gemischten Disulfiden mit Glutathion verbunden sein. Eine anschließende Isolierung des Assoziates aus dem Kopplungsansatz ist jedoch durch Einsatz geeigneter Reinigungsverfahren möglich.

#### IV.2.4. FBP11-WW1/Polyprolin im Vergleich mit anderen Assoziationsverfahren

Die geringe Größe von WW-Domäne und prolinreichem Ligand, ihre spezifischen Bindungseigenschaften sowie die gute Herstellbarkeit und Stabilität stellen wesentliche Aspekte beim Einsatz der beiden Komponenten als Heterodimerisierungsmotiv dar. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, läßt sich die spezifische Kopplung von WW-Domäne und prolinreichem Ligand dazu nutzen, um eine gerichtete und stabile Assoziation von Proteinen zu vermitteln, die mit Cysteinvarianten der WW-Domäne FBP11-WW1 bzw. eines prolinreichen Liganden, der das PPLP-Motiv enthielt, fusioniert wurden. Die dabei ausgebildete intermolekulare Disulfidbrücke zwischen den beiden Kopplungspartnern vermittelte die Stabilität des Komplexes unter nicht-reduzierenden Bedingungen, während die moderat-affine, aber spezifische Bindung der WW-Domäne an prolinreiche Liganden die gerichtete Kopplung sicherstellte.

In letzter Zeit sind mehrere Verfahren etabliert und beschrieben worden, die ebenfalls eine Assoziation von Proteinen, vermittelt durch gentechnisch fusionierte Heterodimerisierungsmotive, bewerkstelligen können. Ursprung und Eigenschaften dieser Systeme sind dabei sehr unterschiedlich und oftmals mit sehr spezifischen Anwendungen verknüpft (vgl. Tabelle 2, Abschnitt I.1.2). Den Anfang bildeten Ansätze in der Grundlagenforschung, in denen z.B. natürliche Oligomerisierungsmotive von Signaltransduktionskomplexen ersetzt wurden, um deren Funktion näher zu analysieren (Kouzarides & Ziff, 1989; Schmidt-Dorr et al., 1991). Daneben stellt das Gebiet der rekombinanten Herstellung von Antikörpern bzw. ihrer Fragmente sowie das Design künstlicher Antikörperkonstrukte ein weites Feld dar, vor dessen Hintergrund zahlreiche Systeme zur gerichteten Assoziation von Proteinen erarbeitet wurden (Tabelle 2). Ziel dieser Bemühungen war einerseits die Erhöhung der Effizienz bei der rekombinanten Herstellung von Antikörpern bzw. davon abgeleiteten Fragmenten und andererseits die Generierung von Antikörpern mit verbesserten oder völlig neuen Eigenschaften, wie z.B. Bispezifität, erhöhter Affinität und Funktionalität.

Ein Großteil der Arbeiten auf diesem Gebiet basiert auf der Assoziation von amphiphilen Helices vermittelt durch hydrophobe Aminosäuren unter Beteiligung von Leucin-Resten (*leucine zipper*-Motiv). Dazu gehört das sogenannte Vier-Helix-Bündel, das aus kurzen  $\alpha$ -Helices ( $\sim 15$  Aminosäuren) gebildet wird und sowohl eine Dimerisierung als auch Tetramerisierung von heterologen Proteinen ermöglicht (Eisenberg et al., 1986; DeGrado et al., 1987; Pack et al., 1993). In ähnlicher Weise wurden  $\alpha$ -helikale Dimerisierungsmotive von den Transkriptionsfaktoren Jun, Fos sowie GCN4 abgeleitet, die sogenannte *coiled coils* (umeinander gewundene, parallele oder antiparallele  $\alpha$ -Helix-Paare,  $\sim 30$  Aminosäuren) bilden und dadurch eine Assoziation fusionierter Proteine vermitteln können (O'Shea et al., 1989a; O'Shea et al., 1991; O'Shea et al., 1993). Ein weiteres System stellen die polyionischen Fusionspeptide dar, deren Dimerisierung auf elektrostatischen Wechselwirkungen kurzer, entgegengesetzt geladener Aminosäuresequenzen (z.B. poly-Arginin/Lysin und poly-Glutamat,  $\sim 10$  Aminosäuren) beruht (Richter et al., 2001). Nicht zuletzt sind auch WW-Domäne und prolinreiche Sequenz in dieser Hinsicht als ein kompaktes Heterodimerisierungsmotiv zu bezeichnen. Auf dessen Vor- und Nachteile im Vergleich zu *coiled coils* und polyionischen Fusionspeptiden soll an dieser Stelle näher eingegangen werden.

Ein wesentlicher Vorteil von Assoziationsmotiven geringer Größe besteht in ihrer nahezu universellen Anwendbarkeit in Form von terminalen Fusionen oder Insertion der entsprechenden Sequenzen an bzw. in die jeweiligen Zielproteine. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zwar ausschließlich mit einer C-terminalen Fusion der WW-Domäne FBP11-WW1 gearbeitet (GST-WW), jedoch sind für dieses System weitere artifizielle Fusionskonstrukte beschrieben, wie z.B. mit dem Hüllprotein VP1 des murinen Polyomavirus. Dabei konnte der Erhalt der Funktionalität von FBP11-WW1 sowohl in Form einer N-terminalen Fusion als auch einer Insertion nachgewiesen werden (Günther et al., 2001; Schmidt et al., 2001). Insbesondere in letzterem Fall erwies sich die Zugänglichkeit und räumliche Nähe von N- und C-Terminus der WW-Domäne von Vorteil für ihre Insertion in geeignete Regionen des Zielproteins. Auch in der Natur sind keine bevorzugten Positionen von WW-Domäne und prolinreicher Sequenz feststellbar, beide Interaktionsmotive treten im Kontext unterschiedlichster Proteinumgebungen auf, was ihre Unabhängigkeit und Vielseitigkeit belegt (Sudol et al., 2001; Sudol & Hunter, 2000). Im Fall der polyionischen Fusionspeptide besteht der Vorteil darin, daß für die Heterodimerisierung lediglich kurze Peptide notwendig sind, die für die Assoziation vermutlich keine definierte Sekundärstruktur ausbilden müssen und daher leicht fusionier- und inserierbare Sequenzen darstellen. Auf diese Weise ließen sich z.B. anhand von N- bzw. C-terminalen Fusionen der Sequenzen mit Antikörperfragmenten, Enzymen sowie Toxinen bifunktionelle Moleküle herstellen, deren polyionische Sequenzen die Assoziation vermittelte, während die Stabilität dieser Komplexe durch eine artifizielle, intermolekulare Disulfidbrücke erhöht wurde (Richter et al., 2001; Kleinschmidt et al., 2003; Kurschus et al., 2004). Durch Insertion einer polyanionischen Sequenz in einen oberflächenexponierten Loop des Polyoma Hüllproteins VP1 konnte dem gleichen Prinzip folgend die Assoziation eines polykationischen Antikörperfragmentes auf der Außenseite von virusähnlichen Kapsiden bewerkstelligt werden (Stubenrauch et al., 2001).

Der Einsatz von *leucine-zipper*-Fusionen zur Bildung oligomerer Proteinzustände steht bereits seit geraumer Zeit im Mittelpunkt von Arbeiten zur gerichteten Assoziation von heterologen Proteinen. Deren Anwendungen konnten bereits durch zahlreiche Beispiele belegt werden (Tabelle 2, O'Shea et al., 1993, Übersichtsartikel: Müller et al., 2000; Rieker & Hu, 2000). Die amphiphilen  $\alpha$ -Helices wurden dabei nahezu ausschließlich in Form von N- bzw. C-terminalen Fusionen der jeweiligen Proteine eingesetzt, wofür dieses System prädestiniert ist. Dabei determinieren vermutlich strukturelle Aspekte die Einsatzmöglichkeiten der langgestreckten, helikalen *coiled coils*, die aufgrund der räumlichen Trennung von N- und C-Terminus für eine Insertion in Proteine eher ungeeignet erscheinen (O'Shea et al., 1991). Terminale Fusionen des *leucine-zipper*-Motivs wurden größtenteils von flexiblen Linkersequenzen flankiert, um eine Beeinträchtigung von Struktur und Funktion des Fusionspartners durch die relativ rigiden *coiled coils* zu vermeiden (Pack & Plückthun, 1992; Plückthun & Pack, 1997; Arndt et al., 2001). Ein wesentlicher Vorteil des Systems beruht auf der hohen Affinität, repräsentiert durch Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich (Chao et al., 1996; Arndt et al., 2000), die anhand von *de novo* generierten *coiled coils* sogar auf subnanomolare Größenordnungen gebracht werden konnten (Litowski & Hodges, 2002; De Crescenzo et al., 2003). Aus dem Vergleich zu den mikromolaren  $K_D$ -Werten der polyionischen Wechselwirkung (Richter et al., 2001) sowie der Interaktion von WW-Domänen mit prolinreichen Liganden erübrigt sich vermutlich auch die Notwendigkeit der Stabilisierung von *coiled coils* durch intermolekulare Disulfidverbrückung, die allerdings auch für dieses System beschrieben wurde (Pack & Plückthun, 1992; Zhou et al., 1993; Lavigne et al., 1995; Terskikh et al., 1997). Der Vorteil hoher Affinität könnte sich in bestimmten Anwendungen jedoch auch als nachteilig erweisen, wenn eine kontrollierte Aufhebung der Heterodimerisierung (z.B. im Rahmen einer intrazellulären Wirkstofffreisetzung) erforderlich ist. Disulfidverbrückte Proteinkomplexe, denen eine geringere Affinität zugrunde liegt, ermöglichen

dagegen eine durch Redoxbedingungen modulierbare Assoziation bzw. Dissoziation (vgl. Abschnitt IV.2.1).

Die Interaktion von *leucine-zipper*-Motiven beruht im wesentlichen auf Wechselwirkungen repetitiver hydrophober Aminosäuren (Leucin, Isoleucin) zwischen zwei amphiphilen Helices (Hu et al., 1990; O'Shea et al., 1991; Zhou et al., 1992), wobei Spezifität und Orientierung (parallel bzw. antiparallel) dieser Assoziation durch geladene Aminosäuren determiniert wird (Monera et al., 1994; Kohn et al., 1995). Letztere bestimmen auch die Tendenz der amphiphilen Helices, sich zu Homo- bzw. Heterodimeren zusammenzulagern. Während das *leucine zipper*-Motiv von GCN4 ein Homodimer ausbildet, zeigen von *Jun* und *Fos* abgeleitete Sequenzen eine präferentielle Heterodimerisierung (Landschulz et al., 1988; O'Shea et al., 1989b; Monera et al., 1993). Ein Großteil der dazu durchgeführten Experimente basierte auf der Analyse intermolekularer Disulfidverbrückung unter Redoxgleichgewichtsbedingungen (analog zur vorliegenden Arbeit, Abschnitt III.3.4.3), die infolge der Assoziation zwischen den *coiled coils* erfolgte. Zur Erinnerung sei erwähnt, daß unter ähnlichen Redoxbedingungen auch die WW-Domäne und prolinreiche Liganden keinerlei Homodimerisierungstendenzen zeigen. Letztere treten erst im Zuge einer Oxidation vermittelt durch Luftsauerstoff in Erscheinung und können vermutlich auch für heterodimerisierende *coiled coils* nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Im Fall der polyionischen Fusionspeptide verhindert die elektrostatische Abstoßung zwischen gleichartig geladenen Sequenzen eine Homodimerisierung der Kopplungspartner (Richter et al., 2001). Allerdings wird die favorisierte Heterodimerbildung durch Erhöhung der Ionenstärke im Lösungsmittel deutlich zurückgedrängt. So kommt es z.B. in Gegenwart von 200 mM NaCl zu einer Verringerung der Dimerisierungseffizienz um etwa 50%, Ionenstärken über 400 mM NaCl heben die gerichtete Assoziation nahezu vollständig auf. Da auch im Fall der *coiled coils* geladene Aminosäuren an der Wechselwirkung beteiligt sind, kann davon ausgegangen werden, daß auch dieses System von erhöhten Ionenstärken beeinträchtigt wird und ggf. einen Spezifitätsverlust zeigt. Im Gegensatz dazu wurde für die Interaktion von WW-Domänen mit prolinreichen Sequenzen eine Zunahme der Affinität mit Erhöhung der Salzkonzentration beobachtet (Abschnitt III.1.5.5), was auf den hydrophoben Charakter der zugrundeliegenden Wechselwirkungen zurückgeführt wurde. Diese Eigenschaft stellt einen wesentlichen Vorteil dieses Systems dar, da es auch dann zur Anwendung gebracht werden kann, wenn das Vorhandensein erhöhter Ionenstärken als kritisch für die Stabilität und Struktur der beteiligten Proteine angesehen werden kann (vgl. Abschnitt IV.2.5). Inwiefern die Spezifität der Ligandenbindung von FBP11-WW1 durch hohe Salzkonzentrationen beeinflusst wird, läßt sich an dieser Stelle jedoch nicht beurteilen und muß durch weitere Bindungsanalysen geklärt werden.

Auf den Vorteil der augenscheinlich hohen Stabilität von WW-Domäne und prolinreichen Sequenzen gegenüber proteolytischen Abbau wurde bereits eingegangen (Abschnitt IV.2.1). Im Gegensatz dazu scheinen die geladenen Abschnitte von N-terminalen polyionischen und *coiled coil*-Fusionsproteinen eine höhere Proteolyseanfälligkeit zu zeigen (Richterova et al., 2001; Arndt et al., 2000). Diese Eigenschaft kann einerseits die Effizienz von Herstellung und Assoziation der heterologen Proteine herabsetzen, aber auch im Fall einer Anwendung *in vivo* zu einer vorzeitigen Dissoziation des Heterodimers führen, woraus ggf. unerwünschte Nebenwirkungen für den Organismus resultieren können. Ob in diesem Aspekt tatsächlich ein relevanter Vorteil des hier vorgestellten Kopplungsverfahrens besteht, wird sich jedoch erst in der realen Anwendung herausstellen.

An dieser Stelle soll auf einen potentiellen Nachteil der Verwendung natürlicher Heterodimerisierungsmotive hingewiesen werden, der auch für das hier erarbeitete WW-Domänenbasierte Kopplungsverfahren relevant sein kann. Die biologische Bedeutung von WW-Domänen bei der Signaltransduktion impliziert, daß die *in vivo*-Anwendung von entsprechenden Fusions-



proteinen zur Beeinträchtigung zellulärer Prozesse führen kann. Diese unerwünschten Nebeneffekte sollte man allerdings nur dann erwarten, wenn biologisch signifikante Konzentrationen der Konstrukte an Orte gelangen, an dem auch die natürliche Interaktion stattfindet.

Im Fall des nukleären Proteins FBP11, das vermutlich die Assoziation bestimmter Proteine des Spleissosoms vermittelt, könnte das ggf. zu einer Beeinträchtigung von Prozessen der mRNA-Reifung führen, deren Konsequenz an dieser Stelle nicht einschätzbar sind (vgl. Abschnitt I.2.4, Bedford et al., 1998). Daneben wurde FBP11 auch eine inhibitorische Funktion bei der N-WASP-vermittelten Aktinpolymerisation zugeschrieben, die eine wichtige Rolle bei der Reorganisation des Cytoskeletts spielt (Mizutani et al., 2004). Auch in diesem Kontext könnte sich eine *in vivo*-Anwendung von FBP11-WW1- und PPLP-Fusionsproteinen problematisch gestalten. Inwiefern diese potentiellen Nebenwirkungen tatsächlich physiologisch relevant sind und im Kontext der jeweiligen Anwendung zur Geltung kommen, wird sich erst anhand von geeigneten experimentellen Studien (z.B. in Zellkultur) beurteilen lassen.

Neben den bereits diskutierten Systemen sind in der Literatur auch Verfahren beschrieben, in denen eine Assoziation durch komplexere Motive bzw. ganze Proteinuntereinheiten vermittelt wird. So konnte die Affinität von Streptavidin zu Biotin und weiteren Bindepeptiden genutzt werden, um die Kopplung von Antikörperfragmenten aber auch anderen Molekülen zu bewirken (Schmidt & Skerra, 1993; Weiss et al., 1994; Dübel et al., 1995). Ebenso wurde die Heterodimerisierung von Antikörperfragmenten, vermittelt durch Fusion an konstante Domänen der Immunglobuline (Müller et al., 1998c; Schoonjans et al., 2000), an die Tetramerisierungsdomäne von p53 (Rheinhecker et al., 1996) sowie an Calmodulin (Neri et al., 1995) erreicht. Andere Ansätze involvierten Fragmente der humanen Ribonuklease A (S-Protein/S-Peptid, Dübel, 1999) sowie die Immunglobulin-Bindungseigenschaften von Protein A aus *Staphylococcus aureus*, um eine Assoziation an Antikörper zu erreichen (Sanna et al., 1995). Zu letzterer Strategie gehört auch die Insertion der Immunglobulin-bindenden Domäne Z aus Protein A in verschiedene Virushüllproteine, wodurch eine Bindung von Antikörpermolekülen an die Oberfläche von künstlichen Viruskapsiden bewerkstelligt werden konnte (Ohno et al., 1997; Gleiter & Lilie, 2001). Den genannten Verfahren ist gemeinsam, daß die Assoziationsdomänen teilweise von vollständigen Proteinen oder Proteindomänen abgeleitet sind, die z.T. wesentlich größer sind als das in dieser Arbeit vorgestellte Heterodimerisierungsmotiv. Dabei kann sich bereits die Herstellung der entsprechend größeren Fusionsproteine problematisch gestalten und es besteht die Gefahr, daß die Assoziationsdomäne den Fusionspartner in Funktion und Stabilität beeinträchtigt. Nicht zuletzt ist im Rahmen einer Anwendung im humanen Organismus auch die Gefahr einer erhöhten Immunogenität gegeben, insbesondere wenn die entsprechenden Proteine bakteriellen Ursprungs sind. Ein Vorteil dieser Systeme besteht jedoch in der höheren Affinität und Spezifität, die diese komplexeren Moleküle vermitteln können (z.B. Streptavidin/Biotin,  $K_D = 10^{-15}$  M), so daß die erhaltenen Assoziate im allgemeinen nicht durch zusätzliche Wechselwirkungen, wie z.B. Disulfidbrücken, stabilisiert werden müssen. Zudem erlauben einige dieser Systeme neben einer Dimerisierung auch eine Tri- und Tetramerisierung der jeweiligen Fusionspartner, womit im Fall der Herstellung künstlicher Antikörper sowohl Mehrfachspezifitäten als auch deutlich erhöhte Affinitäten gegenüber dem Antigen realisiert werden können (Kipriyanov et al., 1995; Rheinhecker et al., 1996; Plückthun & Pack, 1997).

#### IV.2.5. Szenario einer Anwendung: Modulares Vektorsystem basierend auf VP1

Für das hier vorgestellte Kopplungssystem ergeben sich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. Die Heterodimerisierung von zwei Proteinen, jeweils in Fusion mit der WW-Domäne bzw. einer Polyprolinsequenz, zu einem binären Assoziat kann zur Herstellung bifunktionaler Proteine eingesetzt werden (z.B. Antikörper-Enzym-Konjugate, modulare Immuntoxine, bispezifische

Antikörperfragmente, etc.). Die Bedeutung derartiger Moleküle für die Grundlagenforschung, biotechnologische Anwendungen sowie Therapie und Diagnostik wird anhand von zahlreichen Beispielen deutlich, die sich mit Hilfe bereits verfügbarer Heterodimerisierungsmotive (*coiled coils*, polyionische Fusionspeptide, etc.) realisieren ließen und in Abschnitt I.1.2 dieser Arbeit vorgestellt wurden (Tabelle 2).

Im Rahmen dieses Abschnittes soll jedoch auf eine spezielle Anwendungsmöglichkeit eingegangen werden, die das hier vorgestellte Kopplungsverfahren als Bestandteil eines neuartigen, modularen Vektorsystems für therapeutische Anwendungen involviert. Anhand dieses Beispiels sollen insbesondere die Vorteile der Verfügbarkeit mehrerer, z.T. komplementärer Assoziationsverfahren verdeutlicht werden. Der gleichzeitiger Einsatz verschiedener Kopplungsverfahren erscheint immer dann sinnvoll, wenn die Herstellung komplexerer, "multifunktionaler" Proteinassoziate von Interesse ist, in die mehr als zwei Komponenten involviert sind und deren Assoziation möglichst spezifisch erfolgen soll.

Basis dieses Vektorsystems stellt das Hüllprotein VP1 des murinen Polyomavirus dar, das sich rekombinant in *E.coli* exprimieren und unter geeigneten Bedingungen *in vitro* zu virusähnlichen Partikeln (VLPs) assemblieren läßt (Leavitt et al., 1985; Salunke et al., 1986; Salunke et al., 1989). Diese VLPs weisen einen Durchmesser von etwa 45 nm auf und ähneln in ihrer Geometrie dem viralen Viruskapsid, das aus 72 pentameren VP1-Kapsomeren aufgebaut ist und eine ikosaedrische Symmetrie besitzt. Die Struktur von VP1-Pentameren in der isolierten als auch zum Kapsid assemblierten Form ist aufgeklärt (Stehle et al., 1994; Stehle & Harrison, 1997; Stehle & Harrison, 1996). Polyomavirus zeigt einen breiten Tropismus innerhalb des murinen Wirtes. Im Zuge der Infektion findet eine Bindung von VP1 an Sialylsäure-Gruppen von Glykolipiden an der Zelloberfläche statt (Tsai et al., 2003; Smith et al., 2003). Der genaue Weg der anschließenden Zellaufnahme sowie das intrazelluläre Schicksal von Polyomaviren und VLPs sind bisher allerdings nur unvollständig verstanden (Richterova et al., 2001; May et al., 2002; Mannova & Forstova, 2003). In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, daß sich mit Hilfe von VLPs aus Polyoma-VP1 Moleküle wie DNA, Oligonukleotide, Peptide und Proteine in eukaryontische Zellen transportieren lassen (Forstova et al., 1995; Braun et al., 1999; Krauzewicz et al., 2000; Günther et al., 2001; Stubenrauch et al., 2001; May et al., 2002; Gleiter & Lilie, 2003; Abbing et al., 2004).

In ihrer Eigenschaft, Substanzen in den Kapsidinnenraum einschließen zu können und somit vor Abbau sowie unerwünschter Freisetzung zu schützen, scheinen VLPs geeignete Transportvehikel darzustellen, die als Basis eines Vektorsystems für molekulare Therapien dienen können. Die Entwicklung solcher virusbasierter bzw. virusanaloger Vektorsysteme stellt eine große Herausforderung dar, bei der eine Vielzahl kritischer Aspekte wie z.B. Verfügbarkeit, Homogenität, Verpackungseffizienz, Immunogenität, Zellspezifität, subzelluläre Lokalisation sowie biologische Wirksamkeit und Sicherheit zu berücksichtigen sind. Demzufolge gestaltet sich ihre Herstellung und Anwendung bisher oftmals als schwierig und zeigte in klinischen Tests nur ungenügende Effizienz in Gegenwart zahlreicher Nebenwirkungen (Verma & Somia, 1997; Anderson, 1998; Russell & Clarke, 1999).

Die Vorteile eines modularen Vektorsystems bestehen in der separaten Herstellung und Reinigung der einzelnen Komponenten, sowie der kontrollierten *in vitro*-Beladung und Assemblierung des Transport-Vehikels unter definierten Bedingungen und Minimierung biologischer Sicherheitsrisiken, die z.B. bei der *in vivo*-Herstellung viraler Vektorsysteme durch bestimmte Verpackungszelllinien von Bedeutung sind (z.B. durch Rekombinationsereignisse, Anderson, 1998). Die für die jeweilige Anwendung notwendigen Eigenschaften des Systems (z.B. Spezifität für einen bestimmten Zelltyp, Art der therapeutischen Fracht, etc.) sind dabei idealerweise im "Baukastenprinzip" kombinierbar und erlauben dadurch eine hohe Flexibilität des

Systems für vielseitige Anwendungen. Im Kontext der virusähnlichen Partikel basiert diese Flexibilität auf den vielfältigen Möglichkeiten, die natürlichen Eigenschaften des Hüllproteins VP1 zu modifizieren bzw. durch Einbringen geeigneter Sequenzen mit neuen Funktionen zu ergänzen.

Allerdings erwies sich dabei die Insertion vollständiger Proteine (z.B. in Form des Enzyms Dihydrofolatreduktase) als ungünstig, was sich in der herabgesetzten Stabilität des Fusionskonstruktes VP1-DHFR äußerte (Gleiter et al., 1999). Erfolgversprechender war dagegen die Insertion kurzer Peptide bzw. kleiner Proteindomänen an eine geeignete Position von VP1, die als Heterodimerisierungsmotiv fungieren und die Assoziation von Proteinen mit bestimmten Funktionen ermöglichen.

Auf diese Weise wurde beispielsweise die Kopplung von "Adressierungsmodulen" an die Außenseite von VP1-Kapsiden in Form eines Antikörpers bzw. Antikörperfragmentes bewerkstelligt, der die zelltypspezifische Adressierung (*targeting*) der VLP vermittelte. Unter Verwendung einer VP1-Variante, die an geeigneter Position die polyanionische Sequenz E<sub>8</sub>C trug, und dem Fv-Fragment des Antikörpers B3, an das die polykationische Sequenz R<sub>8</sub>CP fusioniert war, konnten pro Kapsid etwa 30-40 Fv-Fragmente gekoppelt werden, die eine Tumorzellspezifität (LewisY-Antigen) der VLPs vermittelten (Stubenrauch et al., 2001).

In einem alternativen Ansatz wurde die Immunglobulinbindende Domäne Z von Protein A aus *Staphylococcus aureus* verwendet, und als spezifisches Assoziationsmodul für Immunglobuline in VP1 inseriert. Mit Hilfe dieser Variante (VP1-Z) konnte mit hoher Effizienz der Antikörper Herceptin an die Außenseite von VP1-Kapsiden gebunden werden und dadurch eine zelltypspezifische Adressierung der VLPs erreicht werden, die auf der Erkennung des tumorassoziierten Oberflächenrezeptors ErbB2 basiert (Gleiter & Lilie, 2003; Gleiter & Lilie, 2001). Allerdings involviert die Bindung von Immunglobulinen an VP1-Z keine kovalente Stabilisierung der Interaktion (z.B. durch eine Disulfidbrücke) und unterliegt daher einem Assoziations-/Dissoziations-Gleichgewicht. Im Zuge einer möglichen *in vivo*-Applikation könnten die gebundenen Antikörpermodule im humanen Serum mit anderen Immunglobulinen austauschen und so zu einem Spezifitätsverlust bzw. Fehladressierung der VLPs führen.

Mit der Verfügbarkeit des Kopplungssystems basierend auf WW-Domänen und prolinreichen Liganden sollte nun ein weiteres Kopplungssystem einsetzbar sein, das die "Modularität" und Flexibilität des Vektorsystems erhöhen kann.

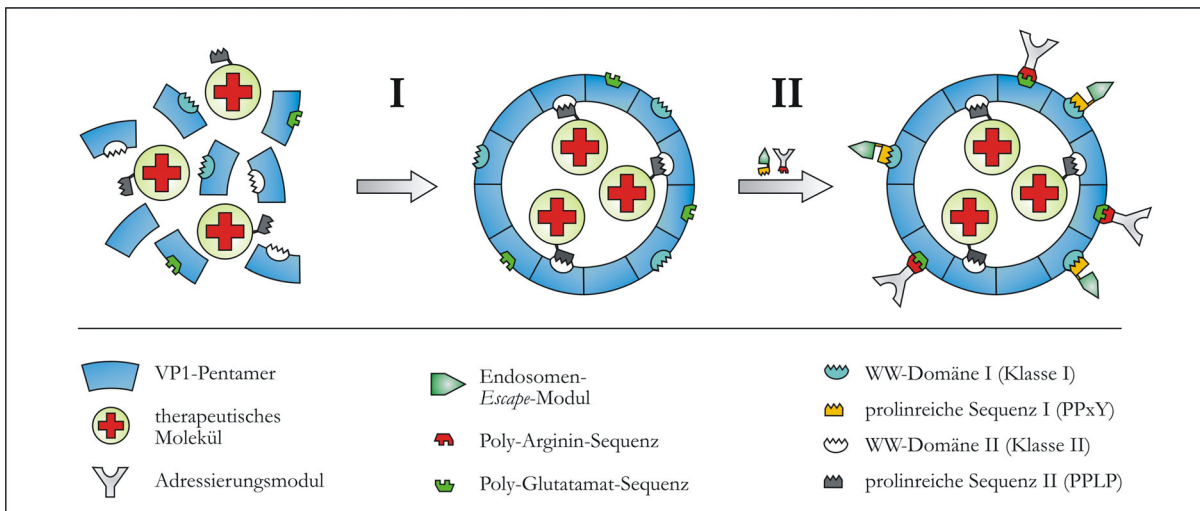
Die Machbarkeit von Fusionen der WW-Domäne in VP1 konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden. Dabei wurde FBP11-WW1 sowohl in einen geeigneten Loop von VP1 inseriert bzw. am N-Terminus fusioniert. In beiden Fällen resultierten daraus stabile VP1-Varianten, die sich zu virusähnlichen Partikeln assemblieren ließen und die charakteristischen Bindungseigenschaften zu prolinreichen Liganden zeigten. In assemblierten VLPs war die inserierte WW-Domäne auf der Kapsidaußenseite lokalisiert, die analog den zuvor beschriebenen VP1-Varianten dazu verwendet werden sollte, um geeignete Polyprolin-Fusionsproteine an die Kapsidoberfläche zu binden. So konnte modellhaft die Assoziation einer prolinreichen GFP-Variante nachgewiesen werden, die allerdings einer schnellen Dissoziation unterlag, da die Wechselwirkung nicht durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wurde (Schmidt et al., 2001).

Die Fusion von FBP11-WW1 an den N-Terminus von VP1 bewirkte dagegen eine Assoziation von Molekülen, die sich nach der Assemblierung im Kapsidinnenraum befinden und diente damit einer gerichteten Verpackung von Peptiden und Proteinen, an die zu diesem Zweck eine Polyprolinsequenz fusioniert worden war. Auch diese Bindung involvierte keine Disulfidverbrückung von WW-Domäne und Ligand, zeigte jedoch die prinzipielle Funktionsweise des Verfahrens am Beispiel des Einschlusses von GFP bzw. fluoreszenzmarkierten Peptiden (Günther et al., 2001).

Mit dem hier vorgestellten Kopplungssystem basierend auf WW-Domäne und prolinreichem Ligand steht nun ein weiterentwickeltes Verfahren zur Verfügung, um eine stabilere Assoziation verschiedener "Module" des Vektorsystems zu gewährleisten. Dabei weist das System im Vergleich zu den zuvor genannten Assoziationsverfahren (polyionische Sequenzen, Domäne Z) sowohl Vor- als auch einige Nachteile auf, weshalb es die vorhandenen Systeme nicht ersetzen, sondern durch seine individuellen Eigenschaften ergänzen soll.

So ließe sich im Rahmen einer gemischten Assemblierung unterschiedlicher VP1-Varianten eine gleichzeitige Assoziation von unterschiedlichen Funktionsmodulen realisieren, die jeweils über ein separates Heterodimerisierungsmotiv gekoppelt werden. In Abbildung 69 ist ein mögliches Szenario dieser Art dargestellt, in dem die zu verpackende therapeutische Substanz ein Peptid oder Protein darstellt, das über eine Fusion mit einem Assoziationsmodul in den Kapsidinnenraum dirigiert wird. Ist dagegen die Verpackung von DNA, RNA oder Oligonukleotiden angestrebt, so müßte dieses Kopplungsmodul entsprechend an die physikochemischen Eigenschaften von Nukleinsäuren angepaßt werden. Alternativ könnte auch der natürliche N-Terminus von VP1 genutzt werden, dessen positive Ladungen ebenfalls DNA-Bindungseigenschaften vermitteln (Chang et al., 1993).

In dem skizzierten Fall (Abbildung 69) werden zwei verschiedene Proteine (Module) auf die Kapsidoberfläche von VLPs gekoppelt: ein Adressierungsmodul (z.B. Antikörperfragment) und ein Protein zur Überwindung endosomaler Membranen (Endosomen-*Escape*-Modul). Letztere Komponente soll die Freisetzung der VLPs bzw. der therapeutischen Substanz aus den Endosomen vermitteln (Günther, C., Dissertation in Vorbereitung). Dabei kommen zwei unterschiedliche Heterodimerisierungsmotive zum Einsatz, die im dargestellten Fall auf dem polyionischen System und WW-Domänen basieren



**Abbildung 69:** Mögliches Szenario der *in vitro*-Herstellung eines modularen, zielgerichteten Vektorsystems für therapeutische Moleküle, basierend auf der Assemblierung von VP1-Pentameren zu virusähnlichen Partikeln. Zur Inkorporation und Assoziation von Proteinen können mehrere Kopplungssysteme mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften verwendet werden. Am gezeigten Beispiel werden polyionische Sequenzen sowie zwei WW-Domänen unterschiedlicher Spezifität (z.B. Klassen I und II), einschließlich der daran bindenden prolinreichen Sequenzen, genutzt, um einerseits eine gerichtete Verpackung der therapeutischen Substanz in den Kapsidinnenraum während der Assemblierung (I) zu erreichen und andererseits die spezifische Kopplung von Molekülen auf der Kapsidaußenseite (II) zu bewerkstelligen, die für die Adressierung (*Targeting*) des Vektors und Überwindung endosomaler Barrieren (Endosomen-*Escape*) verantwortlich sind.

Im ersten Schritt wird die Assemblierung der Virushülle vollzogen, die in Gegenwart von hohen Ionenstärken,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und einem geeigneten Redoxsystem (z.B. Glutathion) stattfindet

(Salunke et al., 1986; Stubenrauch et al., 2001). Parallel zur Kapsid-Assemblierung erfolgt ein gerichteter Einschluß der therapeutischen Fracht, z.B. vermittelt durch die Interaktion zwischen einer N-terminal an VP1 fusionierten WW-Domäne mit einer definierten Spezifität (z.B. Klasse II) und einer entsprechenden prolinreichen Sequenz (PPLP-Motiv) im zu verpackenden Molekül. An dieser Stelle wäre das polyionische System ungeeignet, da diese Wechselwirkung in Gegenwart hoher Ionenstärken aufgehoben und der Einschluß damit ungerichtet wird. Aufgrund der Spezifität der Klasse-II-WW-Domäne an der Kapsid-Innenseite gegenüber der prolinreichen Sequenz des therapeutischen Moleküls sollte keine unspezifische Assoziation der Substanz auf der Kapsidaußenseite erfolgen, an der sich die zweite WW-Domäne (z.B. Klasse I) befindet. Nach der Assemblierung kann die Ionenstärke herabgesetzt werden und in einem zweiten Schritt die parallele Kopplung von Adressierungs- und Endosomen-*Escape*-Modul erfolgen. Das verwendete Adressierungsmolekül enthält zu diesem Zweck eine Polyarginin-Sequenz, das Endosomen-*Escape*-Modul eine geeignete prolinreiche Sequenz (z.B. PPxY-Motiv), über die sie die korrespondierenden Motive (Polyglutamatsequenz bzw. WW-Domäne auf der Kapsidaußenseite) binden. Beide Module werden in Gegenwart eines Redoxsystems und niedrigen Salzkonzentrationen über eine Disulfidbrücke an die Kapsidoberfläche gekoppelt, wobei die Ausbildung unspezifischer (nicht-stabilisierter) Disulfidbrücken ausgeschlossen sein sollte.

Der Vorteil der Verfügbarkeit mehrerer Assoziationsverfahren liegt jedoch nicht nur in der Regulierbarkeit der stöchiometrischen Verhältnisse der an der Kapsidoberfläche gekoppelten Module, sondern auch in der Erweiterung des Spektrums möglicher Kopplungsbedingungen. Auf diese Weise kann das Arsenal funktioneller Module durch Proteine und andere Substanzen ergänzt werden, die sich ggf. nur unter stringenten Bedingungen koppeln lassen (z.B. erhöhte Ionenstärken).

Inwiefern die in dem oben aufgeführten Beispiel gleichzeitige Verwendung von zwei WW-Domänen verschiedener Spezifitätsklassen tatsächlich praktikabel ist und zu einer ausreichenden Diskriminierung der jeweiligen Bindungspartner führt, kann an dieser Stelle noch nicht prognostiziert werden. Die erstaunlich hohe Spezifität von WW-Domänen gegenüber ihren prolinreichen Liganden könnte jedoch eine Basis für derartige Anwendungen darstellen, wobei Optimierungsmöglichkeiten bezüglich ihrer Bindungseigenschaften nicht prinzipiell ausgeschlossen sein sollten (Otte et al., 2003).

So verdeutlicht eine aktuelle Arbeit, daß auch auf Seiten des prolinreichen Liganden, trotz der strukturellen Einschränkungen einer Polyprolin-II-Helix-Konformation, noch geraumes Potential für Proteindesign besteht. So konnten beispielsweise die Bindungseigenschaften eines prolinreichen Liganden einer SH3-Domäne auf ein Peptidgerüst (*scaffold*) übertragen werden, das auf dem Polypeptid APP (*avian pancreatic polypeptide*) beruht. Letzteres vermittelte durch sein spezifische  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur die Ausbildung der Polyprolin-II-Helix-Konformation des Bindungsmotivs, das die ursprüngliche Affinität zu der entsprechenden SH3-Domäne zeigte. Dieses Gerüst gestattete nun die Einführung von neuen Aminosäuren an Positionen des Bindungsmotivs, die sich zuvor als invariant und essentiell für die Ausbildung der Polyprolin-II-Helix herausgestellt hatten und weist damit auf Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Spezifitäten und höherer Affinitäten hin (Cobos et al., 2004).

Dieses Verfahren sollte sich prinzipiell auch auf Liganden von WW-Domänen übertragen lassen und stellt zusammen mit der heutzutage verfügbaren Variantenvielfalt rekombinanter und synthetischer WW-Domänen neue Ansatzpunkte für das *de novo*-Design von anwendungsoptimierten Varianten dieser Moleküle dar (Dalby et al., 2000; Toepert et al., 2003).

## V. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und Charakterisierung eines neuartigen Verfahrens zur gerichteten Assoziation von Proteinen, vermittelt durch die Wechselwirkung von WW-Domänen mit prolinreichen Aminosäuresequenzen. Die Interaktion wird zusätzlich durch eine artifizielle, intermolekulare Disulfidbrücke stabilisiert und stellt somit die Grundlage einer Methode zur gerichteten, kovalenten Verknüpfung von Proteinen dar. WW-Domäne und prolinreiche Sequenz können als vielseitig einsetzbares Heterodimerisierungsmotiv angesehen werden, das sich durch genetische Fusion oder Insertion auf Proteine übertragen läßt, deren spezifische Assoziation und Kopplung von biotechnologischem Interesse ist. Das vorgestellte Kopplungsverfahren basiert auf der WW-Domäne WW1 des murinen Formin-bindenden Proteins 11 (FBP11), deren Bindung an prolinreiche Liganden mit einem PPLP-Motiv beschrieben war.

Im Rahmen der Charakterisierung des Bindungsmotivs wurde die 32 Aminosäuren umfassende, cysteinfreie WW-Domäne FBP11-WW1 in Form einer GST-Fusion in *E.coli* exprimiert und durch Affinitätsreinigung, proteolytische Abspaltung des Fusionspartners GST und präparative RP-HPLC bis zur Homogenität gereinigt. Die charakteristischen spektroskopischen Eigenschaften der isolierten WW-Domäne in der Fluoreszenz, Circular dichroismus und Protonen-Kernresonanz wiesen auf das Vorhandensein der typischen WW-Domänen-Faltungstopologie (dreisträngiges, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt) hin. In qualitativen und quantitativen Stabilitätsanalysen gegenüber thermischer und chemischer Denaturierung zeigte FBP11-WW1 reversible Entfaltungsübergänge, deren relativ geringe Kooperativität charakteristisch für WW-Domänen und andere isolierte Proteindomänen dieser Größe ist.

Die Interaktion von FBP11-WW1 mit prolinreichen Liganden konnte anhand von Bindungsstudien mit synthetischen Peptidliganden, die ein PPLP-Motiv aufwiesen, näher untersucht werden. In quantitativen Fluoreszenz-Titrationsanalysen wurden Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich bestimmt. Untersuchungen zur Abhängigkeit der Dissoziationskonstante von Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke des Lösungsmittels erlaubten die Analyse biophysikalischer Parameter dieser Interaktion, die überwiegend von hydrophoben Wechselwirkungen geprägt wird. Sequenzanalysen des Liganden anhand einer immobilisierten Peptidbibliothek (Spot-Technologie) ließen Rückschlüsse auf die Mindestlänge eines FBP11-WW1-Liganden (PPLPP) und die Rolle des spezifischen Leucin-Restes zu.

FBP11-WW1 stellt einen Vertreter der WW-Domänen-Klasse II dar, deren Bindung an prolinreiche Liganden strukturell bisher noch nicht aufgeklärt war. Im Verlauf der Arbeit konnte durch Einsatz mehrdimensionaler, heteronuklearer NMR-Techniken die Struktur einer doppelt  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierten Variante von FBP11-WW1 bestimmt werden. Aus Strukturdaten der WW-Domäne im Komplex mit dem Liganden APPTPPPLPP ließen sich die molekularen Details der spezifischen Ligandenbindung aufklären. Die Erkennung des PPLP(P)-Motivs beruht einerseits auf bereits bekannten, konservierten Prinzipien der Prolinererkennung, mit der Besonderheit der Einbeziehung einer zweiten hydrophoben Bindungstasche, und andererseits auf bestimmten Aminosäuren in Loop 1 der WW-Domäne, die eine Spezifität für den Leucin-Rest des Liganden vermitteln. Die Orientierung und Erkennung des Liganden ähnelt damit dem Bindungsmodus, der für WW-Domänen der Klasse IV beschrieben wurde.

Das in der vorliegenden Arbeit erarbeitete Verfahren zur stabilen Assoziation von Proteinen erforderte die Einführung der Aminosäure Cystein an geeignete Positionen der WW-Domäne

und des prolinreichen Liganden. Durch rationales Design wurden die FBP11-WW1-Varianten WW-D24C und WW-K35C generiert, die analog zum Wildtyp exprimiert und gereinigt werden konnten. In Untersuchungen von Struktur- und Bindungseigenschaften zeigten beide Varianten ein nahezu identisches Verhalten entsprechend dem cysteinfreien Wildtyp von FBP11-WW1. Im Fall des prolinreichen Liganden wiesen Peptide mit einer Cystein-Substitution außerhalb des PPLP-Motivs (präferentiell an terminalen Positionen) die spezifischen Bindungseigenschaften auf.

Die dem Assoziationsverfahren zugrundeliegende kovalente Kopplung von WW-Domäne und Ligand wurde anhand der Cysteinvarianten von FBP11-WW1 und verschiedenen Peptidliganden etabliert. Einige der disulfidverbrückten Komplexe von WW-K35C zeigten eine erhöhte Stabilität unter stärker reduzierenden Bedingungen, was für WW-D24C nicht beobachtet werden konnte. Diese Stabilisierung korrelierte offensichtlich mit einem obligatorischen Mindestabstand zwischen Cystein und PPLP-Motiv im Liganden und konnte in Form eines Redoxpotentials der Disulfidbrücke im Komplex quantifiziert werden. Konkurrenzexperimente bestätigten, daß die Stabilisierung der Disulfidbrücke auf der Affinität der WW-Domäne zum Polyprolin-Liganden beruht. Zusätzlich deuteten <sup>1</sup>H-NMR-Analysen darauf hin, daß sich in diesen Komplexen die gleichzeitige Kopplung und Bindung des Liganden nicht gegenseitig ausschließen müssen.

Die Anwendung des Kopplungsverfahrens wurde anhand der modellhaften kovalenten Assoziation einer GST-Fusion von WW-K35C mit einer prolinreichen GFP-Variante (SCSGP<sub>8</sub>LPP-GFP) demonstriert. Die Ausbildung der gerichteten Disulfidbrücke zwischen beiden Komponenten ließ sich sowohl durch Cu<sup>2+</sup>-katalysierte Oxidation in Gegenwart von Sauerstoff, als auch unter Verwendung eines Glutathion-basierten Redoxsystems bewerkstelligen. Obwohl das zuletzt genannte Verfahren nicht zur quantitativen Kopplung der Fusionsproteine führte, konnten unter diesen Bedingungen unspezifische Nebenreaktionen, wie z.B. die oxidative Oligomerisierung von GST nahezu vollständig ausgeschlossen werden.

Abschließend wurde anhand von vergleichenden Untersuchungen der thermischen Stabilität gezeigt, daß individuelle Eigenschaften von GST und GFP durch die kovalente Assoziation beider Proteine nicht signifikant beeinträchtigt werden.

Etablierte Systeme zur gerichteten Assoziation von Proteinen stellen seit einiger Zeit ihr technologisches Potential bei der Herstellung artifizieller, multifunktionaler Proteinkomplexe unter Beweis. Sie ergänzen Verfahren der ungerichteten chemischen Proteinkonjugation sowie das gentechnische Methodenarsenal der Herstellung von Fusionsproteinen um die Möglichkeit, definierte Proteinassoziate nach dem "Baukastenprinzip" zu generieren. Das in dieser Arbeit vorgestellte Prinzip der gerichteten Kopplung von Proteinen erweitert das Spektrum derartiger Verfahren und erhöht damit die Flexibilität dieser vielseitig einsetzbaren Assoziationsmodule. Daraus ergeben sich zahlreiche neue Anwendungsmöglichkeiten dieser Systeme in der Entwicklung maßgeschneiderter Proteine für Diagnostik, Therapie und andere Gebiete, die im Zentrum der heutigen biotechnologischen Forschung stehen.

## VI. Literaturverzeichnis

- Abbing, A., Blaschke, U.K., Grein, S., Kretschmar, M., Stark, C.M., Thies, M.J., Walter, J., Weigand, M., Woith, D.C., Hess, J., Reiser, C.O. (2004) Efficient intracellular delivery of a protein and a low molecular weight substance via recombinant polyomavirus-like particles. *J Biol Chem* **279**: 27410-27421.
- Abovich, N. & Rosbash, M. (1997) Cross-intron bridging interactions in the yeast commitment complex are conserved in mammals. *Cell* **89**: 403-412.
- Adzhubei, A.A. & Sternberg, M.J. (1993) Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins. *J Mol Biol* **229**: 472-493.
- Ahmed, A.K., Schaffer, S.W., Wetlaufer, D.B. (1975) Nonenzymic reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by air oxidation and by glutathione oxidoreduction buffers. *J Biol Chem* **250**: 8477-8482.
- Alexander, P., Fahnestock, S., Lee, T., Orban, J., Bryan, P. (1992) Thermodynamic analysis of the folding of the streptococcal protein G IgG-binding domains B1 and B2: why small proteins tend to have high denaturation temperatures. *Biochemistry* **31**: 3597-3603.
- Allen, M., Friedler, A., Schon, O., Bycroft, M. (2002) The structure of an FF domain from human HYPA/FBP11Gebiet. *J Mol Biol* **323**: 411-416.
- Anderson, W.F. (1998) Human gene therapy. *Nature* **392**: 25-30.
- Arndt, K.M., Müller, K.M., Plückthun, A. (2001) Helix-stabilized Fv (hsFv) antibody fragments: substituting the constant domains of a Fab fragment for a heterodimeric coiled-coil domain. *J Mol Biol* **312**: 221-228.
- Arndt, K.M., Pelletier, J.N., Müller, K.M., Alber, T., Michnick, S.W., Plückthun, A. (2000) A heterodimeric coiled-coil peptide pair selected in vivo from a designed library-versus-library ensemble. *J Mol Biol* **295**: 627-639.
- Arndt, K.M., Pelletier, J.N., Müller, K.M., Plückthun, A., Alber, T. (2002) Comparison of in vivo selection and rational design of heterodimeric coiled coils. *Structure (Camb)* **10**: 1235-1248.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D., Seidman, J.G., Smith J.A., Struhl, K. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. Green Publishing and Wiley-Intersciences New York
- Bachovchin, W.W. (1986) <sup>15</sup>N NMR spectroscopy of hydrogen-bonding interactions in the active site of serine proteases: evidence for a moving histidine mechanism. *Biochemistry* **25**: 7751-7759.
- Barshop, B.A., Wrenn, R.F., Frieden, C. (1983) Analysis of numerical methods for computer simulation of kinetic processes: development of KINSIM--a flexible, portable system. *Anal Biochem* **130**: 134-145.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R.D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E.L., Studholme, D.J., Yeats, C., Eddy, S.R. (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **32 Database issue**: D138-D141.



- Baumert, H.G. & Fasold, H. (1989) Cross-linking techniques. *Methods Enzymol* **172**: 584-609.
- Bayer, E., Goettsch, S., Mueller, J.W., Griewel, B., Guiberman, E., Mayr, L.M., Bayer, P. (2003) Structural analysis of the mitotic regulator hPin1 in solution: insights into domain architecture and substrate binding. *J Biol Chem* **278**: 26183-26193.
- Bayer, E.A. & Wilchek, M. (1980) The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Methods Biochem Anal* **26**: 1-45.
- Bedford, M.T., Chan, D.C., Leder, P. (1997) FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands. *EMBO J* **16**: 2376-2383.
- Bedford, M.T. & Leder, P. (1999) The FF domain: a novel motif that often accompanies WW domains. *Trends Biochem Sci* **24**: 264-265.
- Bedford, M.T., Reed, R., Leder, P. (1998) WW domain-mediated interactions reveal a spliceosome-associated protein that binds a third class of proline-rich motif: the proline glycine and methionine-rich motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10602-10607.
- Bedford, M.T., Sarbassova, D., Xu, J., Leder, P., Yaffe, M.B. (2000) A novel pro-Arg motif recognized by WW domains. *J Biol Chem* **275**: 10359-10369.
- Berglund, J.A., Chua, K., Abovich, N., Reed, R., Rosbash, M. (1997) The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. *Cell* **89**: 781-787.
- Boorsma, D.M. & Streefkerk, J.G. (1979) Periodate or glutaraldehyde for preparing peroxidase conjugates? *J Immunol Methods* **30**: 245-255.
- Bork, P. & Sudol, M. (1994) The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci* **19**: 531-533.
- Braun, H., Boller, K., Lower, J., Bertling, W.M., Zimmer, A. (1999) Oligonucleotide and plasmid DNA packaging into polyoma VP1 virus-like particles expressed in Escherichia coli. *Biotechnol Appl Biochem* **29 (Pt 1)**: 31-43.
- Braun, P., Hu, Y., Shen, B., Halleck, A., Koundinya, M., Harlow, E., LaBaer, J. (2002) Proteome-scale purification of human proteins from bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 2654-2659.
- Bregman, D.B., Pestell, R.G., Kidd, V.J. (2000) Cell cycle regulation and RNA polymerase II. *Front Biosci* **5**: D244-D257.
- Brennan, M., Davison, P.F., Paulus, H. (1985) Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science* **229**: 81-83.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., Delano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **54**: 905-921.
- Buschdorf, J.P. & Stratling, W.H. (2004) A WW domain binding region in methyl-CpG-binding protein MeCP2: impact on Rett syndrome. *J Mol Med* **82**: 135-143.
- Camarero, J.A., Pavel, J., Muir, T.W. (1998) Chemical synthesis of a circular protein domain: Evidence for folding-assisted cyclization. *Angewandte Chemie-International Edition* **37**: 347-349.

Carlsson, J., Drevin, H., Axen, R. (1978) Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem J* **173**: 723-737.

Carty, S.M., Goldstrohm, A.C., Sune, C., Garcia-Blanco, M.A., Greenleaf, A.L. (2000) Protein-interaction modules that organize nuclear function: FF domains of CA150 bind the phosphoCTD of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9015-9020.

Cavanagh, J., Wayne, J., Fairbrother, J., Palmer III, A.G., Skelton, N.J. (1996) *Protein NMR Spectroscopy Principles and Practice*. Academic Press

Cawley, D.B., Herschman, H.R., Gilliland, D.G., Collier, R.J. (1980) Epidermal growth factor-toxin A chain conjugates: EGF-ricin A is a potent toxin while EGF-diphtheria fragment A is nontoxic. *Cell* **22**: 563-570.

Chan, D.C., Bedford, M.T., Leder, P. (1996) Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *EMBO J* **15**: 1045-1054.

Chang, A., Cheang, S., Espanel, X., Sudol, M. (2000) Rsp5 WW domains interact directly with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* **275**: 20562-20571.

Chang, D., Cai, X., Consigli, R.A. (1993) Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *J Virol* **67**: 6327-6331.

Chang, H.C., Bao, Z., Yao, Y., Tse, A.G., Goyarts, E.C., Madsen, M., Kawasaki, E., Brauer, P.P., Sacchettini, J.C., Nathenson, S.G., . (1994) A general method for facilitating heterodimeric pairing between two proteins: application to expression of alpha and beta T-cell receptor extracellular segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11408-11412.

Chang, T.M. & Neville, D.M., Jr. (1977) Artificial hybrid protein containing a toxic protein fragment and a cell membrane receptor-binding moiety in a disulfide conjugate. I. Synthesis of diphtheria toxin fragment A-S-S-human placental lactogen with methyl-5-bromovalerimidate. *J Biol Chem* **252**: 1505-1514.

Chao, H., Houston, M.E., Jr., Grothe, S., Kay, C.M., O'Connor-McCourt, M., Irvin, R.T., Hodges, R.S. (1996) Kinetic study on the formation of a de novo designed heterodimeric coiled-coil: use of surface plasmon resonance to monitor the association and dissociation of polypeptide chains. *Biochemistry* **35**: 12175-12185.

Chen, H.I., Einbond, A., Kwak, S.J., Linn, H., Koepf, E., Peterson, S., Kelly, J.W., Sudol, M. (1997) Characterization of the WW domain of human yes-associated protein and its polyproline-containing ligands. *J Biol Chem* **272**: 17070-17077.

Chen, H.I. & Sudol, M. (1995) The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7819-7823.

Chowdhury, P.S., Vasmatzis, G., Beers, R., Lee, B., Pastan, I. (1998) Improved stability and yield of a Fv-toxin fusion protein by computer design and protein engineering of the Fv. *J Mol Biol* **281**: 917-928.

Clark, W.M. (1960) *Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems*. Baltimore

- Cobos, E.S., Pisabarro, M.T., Vega, M.C., Lacroix, E., Serrano, L., Ruiz-Sanz, J., Martinez, J.C. (2004) A Miniprotein Scaffold Used to Assemble the Polyproline II Binding Epitope Recognized by SH3 Domains. *J Mol Biol* **342**: 355-365.
- Cohen, G.B., Ren, R., Baltimore, D. (1995) Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* **80**: 237-248.
- Cooper, A. & Nutley, M.A.W.A. (2001) Differential scanning microcalorimetry. In: Harding SE, Chowdhry B.Z., eds. *Protein-Ligand Interactions: Hydrodynamics and Calorimetry, A Practical Approach*. Oxford University Press 287-318
- Costa, M., Pecci, L., Pensa, B., Cannella, C. (1977) Hydrogen peroxide involvement in the rhodanese inactivation by dithiothreitol. *Biochem Biophys Res Commun* **78**: 596-603.
- Cowan, P.M. & McGavin, S. (1955) Structure of poly-L-proline. *Nature* **176**: 470-478.
- Crane, J.C., Koepf, E.K., Kelly, J.W., Gruebele, M. (2000) Mapping the transition state of the WW domain beta-sheet. *J Mol Biol* **298**: 283-292.
- Creighton, T.E. (1984) Disulfide bond formation in proteins. *Methods Enzymol* **107**: 305-329.
- Creighton, T.E. (1988) Disulphide bonds and protein stability. *Bioessays* **8**: 57-63.
- Dalby, P.A., Hoess, R.H., DeGrado, W.F. (2000) Evolution of binding affinity in a WW domain probed by phage display. *Protein Sci* **9**: 2366-2376.
- Das, S. & Smith, T.F. (2000) Identifying nature's protein Lego set. *Adv Protein Chem* **54**: 159-183.
- David, R., Richter, M.P., Beck-Sickinger, A.G. (2004) Expressed protein ligation. Method and applications. *Eur J Biochem* **271**: 663-677.
- De Crescenzo, G., Litowski, J.R., Hodges, R.S., O'Connor-McCourt, M.D. (2003) Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry* **42**: 1754-1763.
- Deechongkit, S. & Kelly, J.W. (2002) The effect of backbone cyclization on the thermodynamics of beta-sheet unfolding: stability optimization of the PIN WW domain. *J Am Chem Soc* **124**: 4980-4986.
- DeGrado, W.F., Regan, L., Ho, S.P. (1987) The design of a four-helix bundle protein. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52**: 521-526.
- Delano, W.L. (2002) The PyMol Molecular Graphics System (<http://www.pymol.org>).
- Dübel, S. (1999) Reconstitution of human pancreatic Rnase from two separate fragments fused to different single chain antibody fragments: On the way to binary immunotoxins. *Tumor Targeting* **4**: 37-46.
- Dübel, S., Breitling, F., Kontermann, R., Schmidt, T., Skerra, A., Little, M. (1995) Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv). *J Immunol Methods* **178**: 201-209.
- Eftink, M.R. (1997) Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions. *Methods Enzymol* **278**: 221-257.

- Eilat, D., Kikuchi, G.E., Coligan, J.E., Shevach, E.M. (1992) Secretion of a soluble, chimeric gamma delta T-cell receptor-immunoglobulin heterodimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6871-6875.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., Wall, R. (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol* **179**: 125-142.
- Eisenberg, D., Wilcox, W., Eshita, S.M., Pryciak, P.M., Ho, S.P., DeGrado, W.F. (1986) The design, synthesis, and crystallization of an alpha-helical peptide. *Proteins* **1**: 16-22.
- Ermekova, K.S., Zambrano, N., Linn, H., Minopoli, G., Gertler, F., Russo, T., Sudol, M. (1997) The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of Drosophila enabled. *J Biol Chem* **272**: 32869-32877.
- Espanel, X. & Sudol, M. (1999) A single point mutation in a group I WW domain shifts its specificity to that of group II WW domains. *J Biol Chem* **274**: 17284-17289.
- Esser, D. (2000) Dissertation: Etablierung proteinbasierter Transfersysteme.
- Evans, T.C., Jr. & Xu, M.Q. (1999) Intein-mediated protein ligation: harnessing nature's escape artists. *Biopolymers* **51**: 333-342.
- Faber, P.W., Barnes, G.T., Srinidhi, J., Chen, J., Gusella, J.F., MacDonald, M.E. (1998) Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Hum Mol Genet* **7**: 1463-1474.
- Fasman, G.D. (1996) *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. Plenum Press New York
- Fedoroff, O.Y., Townson, S.A., Golovanov, A.P., Baron, M., Avis, J.M. (2004) The structure and dynamics of tandem WW domains in a negative regulator of notch signaling, Suppressor of deltex. *J Biol Chem* **279**: 34991-35000.
- Ferguson, N., Berriman, J., Petrovich, M., Sharpe, T.D., Finch, J.T., Fersht, A.R. (2003) Rapid amyloid fiber formation from the fast-folding WW domain FBP28. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9814-9819.
- Ferguson, N., Johnson, C.M., Macias, M., Oschkinat, H., Fersht, A. (2001a) Ultrafast folding of WW domains without structured aromatic clusters in the denatured state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13002-13007.
- Ferguson, N., Pires, J.R., Toepert, F., Johnson, C.M., Pan, Y.P., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J., Daggett, V., Oschkinat, H., Fersht, A. (2001b) Using flexible loop mimetics to extend phi-value analysis to secondary structure interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13008-13013.
- Forstova, J., Krauzewicz, N., Sandig, V., Elliott, J., Palkova, Z., Strauss, M., Griffin, B.E. (1995) Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum Gene Ther* **6**: 297-306.
- Frank, R. (1992) Spot-Synthesis - An Easy Technique for the Positionally Addressable, Parallel Chemical Synthesis on A Membrane Support. *Tetrahedron* **48**: 9217-9232.
- Frank, R. (2002) The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods* **267**: 13-26.

- Gilbert, H.F. (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **63**: 69-172.
- Gilliland, D.G., Collier, R.J., Moehring, J.M., Moehring, T.J. (1978) Chimeric toxins: toxic, disulfide-linked conjugate of concanavalin A with fragment A from diphtheria toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 5319-5323.
- Gleiter, S. & Lilie, H. (2001) Coupling of antibodies via protein Z on modified polyoma virus-like particles. *Protein Sci* **10**: 434-444.
- Gleiter, S. & Lilie, H. (2003) Cell-type specific targeting and gene expression using a variant of polyoma VP1 virus-like particles. *Biol Chem* **384**: 247-255.
- Gleiter, S., Stubenrauch, K., Lilie, H. (1999) Changing the surface of a virus shell fusion of an enzyme to polyoma VP1. *Protein Sci* **8**: 2562-2569.
- Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I., Plückthun, A. (1990) A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry* **29**: 1362-1367.
- Goddard, T.D. & Keneller, D.G. (2002) Sparky 3. University of California, San Francisco.
- Grauschopf, U., Fritz, A., Glockshuber, R. (2003) Mechanism of the electron transfer catalyst DsbB from *Escherichia coli*. *EMBO J* **22**: 3503-3513.
- Green, N.M. (1963) Avidin. 3. The nature of the Biotin-binding site. *Biochem J* **89**: 599-609.
- Günther, C., Schmidt, U., Rudolph, R., Böhm, G. (2001) Protein and peptide delivery via engineered polyomavirus-like particles. *Faseb Journal* **15**.
- Gurunathan, S., Irvine, K.R., Wu, C.Y., Cohen, J.I., Thomas, E., Prussin, C., Restifo, N.P., Seder, R.A. (1998) CD40 ligand/trimer DNA enhances both humoral and cellular immune responses and induces protective immunity to infectious and tumor challenge. *J Immunol* **161**: 4563-4571.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988) *Antibodies, A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory
- Hermanson, G.T. (1996) *Bioconjugate Techniques*. Academic Press New York
- Holliger, P. & Winter, G. (1993) Engineering bispecific antibodies. *Curr Opin Biotechnol* **4**: 446-449.
- Holtzhauer, M. (1996) *Methoden in der Proteinanalytik*. Springer Berlin
- Hu, H., Columbus, J., Zhang, Y., Wu, D., Lian, L., Yang, S., Goodwin, J., Luczak, C., Carter, M., Chen, L., James, M., Davis, R., Sudol, M., Rodwell, J., Herrero, J.J. (2004) A map of WW domain family interactions. *Proteomics* **4**: 643-655.
- Hu, J.C., O'Shea, E.K., Kim, P.S., Sauer, R.T. (1990) Sequence requirements for coiled-coils: analysis with lambda repressor-GCN4 leucine zipper fusions. *Science* **250**: 1400-1403.
- Huang, X., Poy, F., Zhang, R., Joachimiak, A., Sudol, M., Eck, M.J. (2000) Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nat Struct Biol* **7**: 634-638.

- Ibragimova, G.T. & Wade, R.C. (1999) Stability of the beta-sheet of the WW domain: A molecular dynamics simulation study. *Biophys J* **77**: 2191-2198.
- Ingham, R.J., Gish, G., Pawson, T. (2004) The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* **23**: 1972-1984.
- Jäger, M., Nguyen, H., Crane, J.C., Kelly, J.W., Gruebele, M. (2001) The folding mechanism of a beta-sheet: the WW domain. *J Mol Biol* **311**: 373-393.
- Jiang, X., Kowalski, J., Kelly, J.W. (2001) Increasing protein stability using a rational approach combining sequence homology and structural alignment: Stabilizing the WW domain. *Protein Sci* **10**: 1454-1465.
- Jocelyn, P.C. (1972) *Biochemistry of the SH Group*. Academic Press New York
- Johnson, W.C., Jr. (1988) Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **17**: 145-166.
- Jones, D.P., Carlson, J.L., Mody, V.C., Cai, J., Lynn, M.J., Sternberg, P. (2000) Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* **28**: 625-635.
- Kalandadze, A., Galleno, M., Foncerrada, L., Strominger, J.L., Wucherpfennig, K.W. (1996) Expression of recombinant HLA-DR2 molecules. Replacement of the hydrophobic transmembrane region by a leucine zipper dimerization motif allows the assembly and secretion of soluble DR alpha beta heterodimers. *J Biol Chem* **271**: 20156-20162.
- Kanelis, V., Rotin, D., Forman-Kay, J.D. (2001) Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex. *Nat Struct Biol* **8**: 407-412.
- Karanicolas, J. & Brooks, C.L., III. (2003) The structural basis for biphasic kinetics in the folding of the WW domain from a formin-binding protein: lessons for protein design? *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3954-3959.
- Karpovsky, B., Titus, J.A., Stephany, D.A., Segal, D.M. (1984) Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies. *J Exp Med* **160**: 1686-1701.
- Kato, Y., Nagata, K., Takahashi, M., Lian, L., Herrero, J.J., Sudol, M., Tanokura, M. (2004) Common mechanism of ligand recognition by group II/III WW domains: redefining their functional classification. *J Biol Chem* **279**: 31833-31841.
- Kay, B.K., Williamson, M.P., Sudol, M. (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* **14**: 231-241.
- Kay, L.E. (1995) Pulsed field gradient multi-dimensional NMR methods for the study of protein structure and dynamics in solution. *Prog Biophys Mol Biol* **63**: 277-299.
- Kipriyanov, S.M., Breitling, F., Little, M., Dubel, S. (1995) Single-chain antibody streptavidin fusions: tetrameric bifunctional scFv-complexes with biotin binding activity and enhanced affinity to antigen. *Hum Antibodies Hybridomas* **6**: 93-101.
- Kleinschmidt, M., Rudolph, R., Lillie, H. (2003) Design of a modular immunotoxin connected by polyionic adapter peptides. *J Mol Biol* **327**: 445-452.

- Knapp, S., Mattson, P.T., Christova, P., Berndt, K.D., Karshikoff, A., Vihinen, M., Smith, C.I., Ladenstein, R. (1998) Thermal unfolding of small proteins with SH3 domain folding pattern. *Proteins* **31**: 309-319.
- Koenig, M., Beggs, A.H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Muller, C.R., Lindlof, M., Kaariainen, H., . (1989) The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* **45**: 498-506.
- Koepf, E.K., Petrassi, H.M., Ratnaswamy, G., Huff, M.E., Sudol, M., Kelly, J.W. (1999a) Characterization of the structure and function of W --> F WW domain variants: identification of a natively unfolded protein that folds upon ligand binding. *Biochemistry* **38**: 14338-14351.
- Koepf, E.K., Petrassi, H.M., Sudol, M., Kelly, J.W. (1999b) WW: An isolated three-stranded antiparallel beta-sheet domain that unfolds and refolds reversibly; evidence for a structured hydrophobic cluster in urea and GdnHCl and a disordered thermal unfolded state. *Protein Sci* **8**: 841-853.
- Kohn, W.D., Monera, O.D., Kay, C.M., Hodges, R.S. (1995) The effects of interhelical electrostatic repulsions between glutamic acid residues in controlling the dimerization and stability of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J Biol Chem* **270**: 25495-25506.
- Kostelny, S.A., Cole, M.S., Tso, J.Y. (1992) Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol* **148**: 1547-1553.
- Kouzarides, T. & Ziff, E. (1989) Leucine zippers of fos, jun and GCN4 dictate dimerization specificity and thereby control DNA binding. *Nature* **340**: 568-571.
- Kraemer-Pecore, C.M., Lecomte, J.T., Desjarlais, J.R. (2003) A de novo redesign of the WW domain. *Protein Sci* **12**: 2194-2205.
- Kramer, A. (1996) The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem* **65**: 367-409.
- Kramer, A., Reineke, U., Dong, L., Hoffmann, B., Hoffmuller, U., Winkler, D., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J. (1999) Spot synthesis: observations and optimizations. *J Pept Res* **54**: 319-327.
- Kramer, A. & Schneider-Mergener, J. (1998) Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports. *Methods Mol Biol* **87**: 25-39.
- Kramer, A., Vakalopoulou, E., Schleuning, W.D., Schneider-Mergener, J. (1995) A general route to fingerprint analyses of peptide-antibody interactions using a clustered amino acid peptide library: comparison with a phage display library. *Mol Immunol* **32**: 459-465.
- Kramer, A., Volkmer-Engert, R., Malin, R., Reineke, U., Schneider-Mergener, J. (1993) Simultaneous synthesis of peptide libraries on single resin and continuous cellulose membrane supports: examples for the identification of protein, metal and DNA binding peptide mixtures. *Pept Res* **6**: 314-319.
- Krauzewicz, N. & Griffin, B.E. (2000) Polyoma and papilloma virus vectors for cancer gene therapy. *Adv Exp Med Biol* **465**: 73-82.
- Krauzewicz, N., Stokrova, J., Jenkins, C., Elliott, M., Higgins, C.F., Griffin, B.E. (2000) Virus-like gene transfer into cells mediated by polyoma virus pseudocapsids. *Gene Ther* **7**: 2122-2131.

- Krittanaï, C. & Johnson, W.C. (1997) Correcting the circular dichroism spectra of peptides for contributions of absorbing side chains. *Anal Biochem* **253**: 57-64.
- Kurschus, F.C., Kleinschmidt, M., Fellows, E., Dornmair, K., Rudolph, R., Lilie, H., Jenne, D.E. (2004) Killing of target cells by redirected granzyme B in the absence of perforin. *FEBS Lett* **562**: 87-92.
- Ladbury, J.E., Lemmon, M.A., Zhou, M., Green, J., Botfield, M.C., Schlessinger, J. (1995) Measurement of the binding of tyrosyl phosphopeptides to SH2 domains: a reappraisal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3199-3203.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**: 1759-1764.
- Lavigne, P., Kondejewski, L.H., Houston, M.E., Jr., Sonnichsen, F.D., Lix, B., Skyes, B.D., Hodges, R.S., Kay, C.M. (1995) Preferential heterodimeric parallel coiled-coil formation by synthetic Max and c-Myc leucine zippers: a description of putative electrostatic interactions responsible for the specificity of heterodimerization. *J Mol Biol* **254**: 505-520.
- Leavitt, A.D., Roberts, T.M., Garcea, R.L. (1985) Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in Escherichia coli. *J Biol Chem* **260**: 12803-12809.
- Lim, K., Ho, J.X., Keeling, K., Gilliland, G.L., Ji, X., Ruker, F., Carter, D.C. (1994a) Three-dimensional structure of Schistosoma japonicum glutathione S-transferase fused with a six-amino acid conserved neutralizing epitope of gp41 from HIV. *Protein Sci* **3**: 2233-2244.
- Lim, W.A., Richards, F.M., Fox, R.O. (1994b) Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature* **372**: 375-379.
- Linge, J.P., O'Donoghue, S.I., Nilges, M. (2001) Automated assignment of ambiguous nuclear overhauser effects with ARIA. *Methods Enzymol* **339**: 71-90.
- Linn, H., Ermekova, K.S., Rentschler, S., Sparks, A.B., Kay, B.K., Sudol, M. (1997) Using molecular repertoires to identify high-affinity peptide ligands of the WW domain of human and mouse YAP. *Biol Chem* **378**: 531-537.
- Litowski, J.R. & Hodges, R.S. (2002) Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils. Effects of hydrophobicity and alpha-helical propensity on protein folding, stability, and specificity. *J Biol Chem* **277**: 37272-37279.
- Looman, A.C., Bodlaender, J., de Gruyter, M., Vogelaar, A., van Knippenberg, P.H. (1986) Secondary structure as primary determinant of the efficiency of ribosomal binding sites in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res* **14**: 5481-5497.
- Lu, P.J., Wulf, G., Zhou, X.Z., Davies, P., Lu, K.P. (1999a) The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* **399**: 784-788.
- Lu, P.J., Zhou, X.Z., Shen, M., Lu, K.P. (1999b) Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* **283**: 1325-1328.
- Lundblad, R.L., Kingdon, H.S., Mann, K.G. (1976) Thrombin. *Methods Enzymol* **45**: 156-176.



- Macias, M.J., Gervais, V., Civera, C., Oschkinat, H. (2000) Structural analysis of WW domains and design of a WW prototype. *Nat Struct Biol* **7**: 375-379.
- Macias, M.J., Hyvonen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M., Oschkinat, H. (1996) Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* **382**: 646-649.
- Macias, M.J., Wiesner, S., Sudol, M. (2002) WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett* **513**: 30-37.
- Manning, M.C. & Woody, R.W. (1987) Theoretical determination of the CD of proteins containing closely packed antiparallel beta-sheets. *Biopolymers* **26**: 1731-1752.
- Manning, M.C. & Woody, R.W. (1991) Theoretical CD studies of polypeptide helices: examination of important electronic and geometric factors. *Biopolymers* **31**: 569-586.
- Mannova, P. & Forstova, J. (2003) Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *J Virol* **77**: 1672-1681.
- Matsumura, M., Becktel, W.J., Levitt, M., Matthews, B.W. (1989) Stabilization of phage T4 lysozyme by engineered disulfide bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6562-6566.
- Matsumura, M. & Matthews, B.W. (1991) Stabilization of functional proteins by introduction of multiple disulfide bonds. *Methods Enzymol* **202**: 336-356.
- May, T., Gleiter, S., Lilie, H. (2002) Assessment of cell type specific gene transfer of polyoma virus like particles presenting a tumor specific antibody Fv fragment. *J Virol Methods* **105**: 147-157.
- McTigue, M.A., Williams, D.R., Tainer, J.A. (1995) Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J Mol Biol* **246**: 21-27.
- Merrifield, B. (1986) Solid phase synthesis. *Science* **232**: 341-347.
- Minopoli, G., de Candia, P., Bonetti, A., Faraonio, R., Zambrano, N., Russo, T. (2001) The beta-amyloid precursor protein functions as a cytosolic anchoring site that prevents Fe65 nuclear translocation. *J Biol Chem* **276**: 6545-6550.
- Misra, H.P. (1974) Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. *J Biol Chem* **249**: 2151-2155.
- Mizutani, K., Suetsugu, S., Takenawa, T. (2004) FBP11 regulates nuclear localization of N-WASP and inhibits N-WASP-dependent microspike formation. *Biochem Biophys Res Commun* **313**: 468-474.
- Monera, O.D., Kay, C.M., Hodges, R.S. (1994) Electrostatic interactions control the parallel and antiparallel orientation of alpha-helical chains in two-stranded alpha-helical coiled-coils. *Biochemistry* **33**: 3862-3871.
- Monera, O.D., Zhou, N.E., Kay, C.M., Hodges, R.S. (1993) Comparison of antiparallel and parallel two-stranded alpha-helical coiled-coils. Design, synthesis, and characterization. *J Biol Chem* **268**: 19218-19227.

- Morris, A.E., Remmele, R.L., Jr., Klinke, R., Macduff, B.M., Fanslow, W.C., Armitage, R.J. (1999) Incorporation of an isoleucine zipper motif enhances the biological activity of soluble CD40L (CD154). *J Biol Chem* **274**: 418-423.
- Mosser, E.A., Kasanov, J.D., Forsberg, E.C., Kay, B.K., Ney, P.A., Bresnick, E.H. (1998) Physical and functional interactions between the transactivation domain of the hematopoietic transcription factor NF-E2 and WW domains. *Biochemistry* **37**: 13686-13695.
- Müller, K.M., Arndt, K.M., Alber, T. (2000) Protein fusions to coiled-coil domains. *Methods Enzymol* **328**: 261-282.
- Müller, K.M., Arndt, K.M., Plückthun, A. (1998a) A dimeric bispecific miniantibody combines two specificities with avidity. *FEBS Lett* **432**: 45-49.
- Müller, K.M., Arndt, K.M., Plückthun, A. (1998b) Model and simulation of multivalent binding to fixed ligands. *Anal Biochem* **261**: 149-158.
- Müller, K.M., Arndt, K.M., Strittmatter, W., Plückthun, A. (1998c) The first constant domain (C(H)1 and C(L)) of an antibody used as heterodimerization domain for bispecific miniantibodies. *FEBS Lett* **422**: 259-264.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Muthuswamy, S.K., Gilman, M., Brugge, J.S. (1999) Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol* **19**: 6845-6857.
- Naghibi, H., Tamura, A., Sturtevant, J.M. (1995) Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 5597-5599.
- Neri, D., de Lalla, C., Petrul, H., Neri, P., Winter, G. (1995) Calmodulin as a versatile tag for antibody fragments. *Biotechnology (N Y)* **13**: 373-377.
- Nguyen, H., Jäger, M., Moretto, A., Gruebele, M., Kelly, J.W. (2003) Tuning the free-energy landscape of a WW domain by temperature, mutation, and truncation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3948-3953.
- Nguyen, J.T., Turck, C.W., Cohen, F.E., Zuckermann, R.N., Lim, W.A. (1998) Exploiting the basis of proline recognition by SH3 and WW domains: design of N-substituted inhibitors. *Science* **282**: 2088-2092.
- Nilges, M. & O'Donoghue, S.I. (1998) Ambiguous NOEs and automated NOE assignment. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **32**: 107-139.
- Nozaki, Y. & Tanford, C. (1967) Examination of titration behavior. *Methods Enzymol* **11**: 715-734.
- O'Shea, E.K., Klemm, J.D., Kim, P.S., Alber, T. (1991) X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* **254**: 539-544.
- O'Shea, E.K., Rutkowski, R., Kim, P.S. (1989a) Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* **243**: 538-542.

- O'Shea, E.K., Rutkowski, R., Kim, P.S. (1992) Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer. *Cell* **68**: 699-708.
- O'Shea, E.K., Rutkowski, R., Stafford, W.F., III, Kim, P.S. (1989b) Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. *Science* **245**: 646-648.
- O'Shea, E.K., Lumb, K.J., Kim, P.S. (1993) Peptide 'Velcro': Design of a heterodimeric coiled coil. *Current Biology* **3**: 658-667.
- Ohno, K., Sawai, K., Iijima, Y., Levin, B., Meruelo, D. (1997) Cell-specific targeting of Sindbis virus vectors displaying IgG-binding domains of protein A. *Nat Biotechnol* **15**: 763-767.
- Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* **273**: 1392-1395.
- Otte, L., Wiedemann, U., Schlegel, B., Pires, J.R., Beyermann, M., Schmieder, P., Krause, G., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J., Oschkinat, H. (2003) WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensities of 42 WW domains. *Protein Sci* **12**: 491-500.
- Pace, C.N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol* **131**: 266-280.
- Pace, C.N. & Scholtz M.J. (1997) Measuring the Conformational Stability of a Protein. In: T.Creighton, ed. *Protein Structure: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford 299-322
- Pack, P., Kujau, M., Schroeckh, V., Knupfer, U., Wenderoth, R., Riesenberger, D., Plückthun, A. (1993) Improved bivalent miniantibodies, with identical avidity as whole antibodies, produced by high cell density fermentation of Escherichia coli. *Biotechnology (N Y)* **11**: 1271-1277.
- Pack, P., Muller, K., Zahn, R., Plückthun, A. (1995) Tetravalent miniantibodies with high avidity assembling in Escherichia coli. *J Mol Biol* **246**: 28-34.
- Pack, P. & Plückthun, A. (1992) Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric FV fragments with high avidity in Escherichia coli. *Biochemistry* **31**: 1579-1584.
- Passani, L.A., Bedford, M.T., Faber, P.W., McGinnis, K.M., Sharp, A.H., Gusella, J.F., Vonsattel, J.P., MacDonald, M.E. (2000) Huntingtin's WW domain partners in Huntington's disease post-mortem brain fulfill genetic criteria for direct involvement in Huntington's disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* **9**: 2175-2182.
- Pastan, I. & Fitzgerald, D. (1989) Pseudomonas exotoxin: chimeric toxins. *J Biol Chem* **264**: 15157-15160.
- Pastan, I. & Kreitman, R.J. (2002) Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Investig Drugs* **3**: 1089-1091.
- Pawson, T. & Scott, J.D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* **278**: 2075-2080.
- Pearce, L.A., Oddie, G.W., Coia, G., Kortt, A.A., Hudson, P.J., Lilley, G.G. (1997) Linear gene fusions of antibody fragments with streptavidin can be linked to biotin labelled secondary molecules to form bispecific reagents. *Biochem Mol Biol Int* **42**: 1179-1188.

- Perkinton, M.S., Standen, C.L., Lau, K.F., Kesavapany, S., Byers, H.L., Ward, M., McLoughlin, D.M., Miller, C.C. (2004) The c-Abl tyrosine kinase phosphorylates the Fe65 adaptor protein to stimulate Fe65/amyloid precursor protein nuclear signalling. *J Biol Chem.*
- Philpott, G.W., Bower, R.J., Parker, C.W. (1973) Selective iodination and cytotoxicity of tumor cells with an antibody-enzyme conjugate. *Surgery* **74**: 51-58.
- Pires, J.R., Taha-Nejad, F., Toepert, F., Ast, T., Hoffmuller, U., Schneider-Mergener, J., Kuhne, R., Macias, M.J., Oschkinat, H. (2001) Solution structures of the YAP65 WW domain and the variant L30 K in complex with the peptides GTPPPYTVG, N-(n-octyl)-GPPPY and PLPPY and the application of peptide libraries reveal a minimal binding epitope. *J Mol Biol* **314**: 1147-1156.
- Plückthun, A. & Pack, P. (1997) New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology* **3**: 83-105.
- Porstmann, B., Porstmann, T., Nugel, E., Evers, U. (1985) Which of the commonly used marker enzymes gives the best results in colorimetric and fluorimetric enzyme immunoassays: horseradish peroxidase, alkaline phosphatase or beta-galactosidase? *J Immunol Methods* **79**: 27-37.
- Pullen, S.S., Labadia, M.E., Ingraham, R.H., McWhirter, S.M., Everdeen, D.S., Alber, T., Crute, J.J., Kehry, M.R. (1999) High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry* **38**: 10168-10177.
- Pultke, H. (2003) Diplomarbeit: Einfluß ionischer Flüssigkeiten auf die Faltung und Aggregation des Grün Fluoreszierenden Proteins.
- Rabanal, F., Ludevid, M.D., Pons, M., Giralt, E. (1993) CD of proline-rich polypeptides: application to the study of the repetitive domain of maize glutelin-2. *Biopolymers* **33**: 1019-1028.
- Ramirez, D.M. & Bentley, W.E. (1999) Characterization of stress and protein turnover from protein overexpression in fed-batch E. coli cultures. *J Biotechnol* **71**: 39-58.
- Ranganathan, R., Lu, K.P., Hunter, T., Noel, J.P. (1997) Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* **89**: 875-886.
- Reid, K.L., Rodriguez, H.M., Hillier, B.J., Gregoret, L.M. (1998) Stability and folding properties of a model beta-sheet protein, Escherichia coli CspA. *Protein Sci* **7**: 470-479.
- Reineke, U., Sabat, R., Kramer, A., Stigler, R.D., Seifert, M., Michel, T., Volk, H.D., Schneider-Mergener, J. (1996) Mapping protein-protein contact sites using cellulose-bound peptide scans. *Mol Divers* **1**: 141-148.
- Rentschler, S., Linn, H., Deininger, K., Bedford, M.T., Espanel, X., Sudol, M. (1999) The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol Chem* **380**: 431-442.
- Rheinhecker, M., Hardt, C., Ilag, L.L., Kufer, P., Gruber, R., Hoess, A., Lupas, A., Rottenberger, C., Plückthun, A., Pack, P. (1996) Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen. *J Immunol* **157**: 2989-2997.

- Richter, S.A., Stubenrauch, K., Lilie, H., Rudolph, R. (2001) Polyionic fusion peptides function as specific dimerization motifs. *Protein Eng* **14**: 775-783.
- Richterova, Z., Liebl, D., Horak, M., Palkova, Z., Stokrova, J., Hozak, P., Korb, J., Forstova, J. (2001) Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol* **75**: 10880-10891.
- Rieker, J.D. & Hu, J.C. (2000) Molecular applications of fusions to leucine zippers. *Methods Enzymol* **328**: 282-296.
- Roberts, R.G., Bobrow, M., Bentley, D.R. (1992) Point mutations in the dystrophin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2331-2335.
- Rost, J. & Rapoport, S. (1964) Reduction-Potential of glutathione. *Nature* **201**: 185.
- Rotin, D., Staub, O., Haguenaer-Tsapis, R. (2000) Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* **176**: 1-17.
- Rudolph, R., Boehm, G., Lilie, H., Jaenicke, R. (1997) Folding Proteins. In: Creighton TE, ed. *Protein Function - a practical approach*. IRL Press Oxford
- Russell, C.S. & Clarke, L.A. (1999) Recombinant proteins for genetic disease. *Clin Genet* **55**: 389-394.
- Russo, T., Faraonio, R., Minopoli, G., de Candia, P., De Renzis, S., Zambrano, N. (1998) Fe65 and the protein network centered around the cytosolic domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *FEBS Lett* **434**: 1-7.
- Sali, A. & Blundell, T.L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**: 779-815.
- Salunke, D.M., Caspar, D.L., Garcea, R.L. (1986) Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* **46**: 895-904.
- Salunke, D.M., Caspar, D.L., Garcea, R.L. (1989) Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys J* **56**: 887-900.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Sanna, P.P., De Logu, A., Williamson, R.A., Samson, M.E., Altieri, D.C., Bloom, F.E., Burton, D.R. (1995) Rapid assay of phage-derived recombinant human fabs as bispecific antibodies. *Biotechnology (N Y)* **13**: 1221-1224.
- Santiveri, C.M., Santoro, J., Rico, M., Jimenez, M.A. (2004) Factors involved in the stability of isolated beta-sheets: Turn sequence, beta-sheet twisting, and hydrophobic surface burial. *Protein Sci* **13**: 1134-1147.
- Santoro, M.M. & Bolen, D.W. (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**: 8063-8068.

- Sattler, M., Schleucher, J., Griesinger, C. (1999) Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **34**: 93-158.
- Savage, D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G., Morgensen, S., Conklin, E. (1992) *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*. Pierce Chemical Company Rockford
- Schild, L., Lu, Y., Gautschi, I., Schneeberger, E., Lifton, R.P., Rossier, B.C. (1996) Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *EMBO J* **15**: 2381-2387.
- Schmidt, T.G. & Skerra, A. (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng* **6**: 109-122.
- Schmidt, U., Rudolph, R., Böhm, G. (2001) Binding of external ligands onto an engineered virus capsid. *Protein Eng* **14**: 769-774.
- Schmidt-Dorr, T., Oertel-Buchheit, P., Pernelle, C., Bracco, L., Schnarr, M., Granger-Schnarr, M. (1991) Construction, purification, and characterization of a hybrid protein comprising the DNA binding domain of the LexA repressor and the Jun leucine zipper: a circular dichroism and mutagenesis study. *Biochemistry* **30**: 9657-9664.
- Schoonjans, R., Willems, A., Schoonooghe, S., Fiers, W., Grooten, J., Mertens, N. (2000) Fab chains as an efficient heterodimerization scaffold for the production of recombinant bispecific and trispecific antibody derivatives. *J Immunol* **165**: 7050-7057.
- Sevier, C.S. & Kaiser, C.A. (2002) Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 836-847.
- Simons, P.C. & Vander Jagt, D.L. (1977) Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione-affinity chromatography. *Anal Biochem* **82**: 334-341.
- Singer, A.U. & Forman-Kay, J.D. (1997) pH titration studies of an SH2 domain-phosphopeptide complex: unusual histidine and phosphate pKa values. *Protein Sci* **6**: 1910-1919.
- Skerra, A. & Plückthun, A. (1991) Secretion and in vivo folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in *Escherichia coli*: influence of disulphides and cis-prolines. *Protein Eng* **4**: 971-979.
- Smith, A.E., Lilie, H., Helenius, A. (2003) Ganglioside-dependent cell attachment and endocytosis of murine polyomavirus-like particles. *FEBS Lett* **555**: 199-203.
- Smith, D.B. (2000) Generating fusions to glutathione S-transferase for protein studies. *Methods Enzymol* **326**: 254-270.
- Smith, D.B. & Johnson, K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40.
- Sotgia, F., Lee, H., Bedford, M.T., Petrucci, T., Sudol, M., Lisanti, M.P. (2001) Tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan at its WW domain binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins. *Biochemistry* **40**: 14585-14592.

- Stapley, B.J. & Creamer, T.P. (1999) A survey of left-handed polyproline II helices. *Protein Sci* **8**: 587-595.
- Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J., Rotin, D. (1996) WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na<sup>+</sup> channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J* **15**: 2371-2380.
- Stehle, T. & Harrison, S.C. (1996) Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* **4**: 183-194.
- Stehle, T. & Harrison, S.C. (1997) High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J* **16**: 5139-5148.
- Stehle, T., Yan, Y., Benjamin, T.L., Harrison, S.C. (1994) Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* **369**: 160-163.
- Stevenson, G.T., Pindar, A., Slade, C.J. (1989) A chimeric antibody with dual Fc regions (bisFabFc) prepared by manipulations at the IgG hinge. *Anticancer Drug Des* **3**: 219-230.
- Strickland, E.H. (1974) Aromatic contributions to circular dichroism spectra of proteins. *CRC Crit Rev Biochem* **2**: 113-175.
- Stubenrauch, K., Gleiter, S., Brinkmann, U., Rudolph, R., Lilie, H. (2001) Conjugation of an antibody Fv fragment to a virus coat protein: cell-specific targeting of recombinant polyomavirus-like particles. *Biochem J* **356**: 867-873.
- Sudol, M. (1998) From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'. *Oncogene* **17**: 1469-1474.
- Sudol, M., Bork, P., Einbond, A., Kastury, K., Druck, T., Negrini, M., Huebner, K., Lehman, D. (1995a) Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *J Biol Chem* **270**: 14733-14741.
- Sudol, M., Chen, H.I., Bougeret, C., Einbond, A., Bork, P. (1995b) Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Lett* **369**: 67-71.
- Sudol, M. & Hunter, T. (2000) New wrinkles for an old domain. *Cell* **103**: 1001-1004.
- Sudol, M., Sliwa, K., Russo, T. (2001) Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett* **490**: 190-195.
- Szajewski, R.P. & Whitesides, G.M. (1980) Rate Constants and Equilibrium Constants for Thiol-Disulfide Interchange Reactions Involving Oxidized Glutathione. *J Am Chem Soc* **102**: 2011-2026.
- Takazawa, T., Kamiya, N., Ueda, H., Nagamune, T. (2004) Enzymatic labeling of a single chain variable fragment of an antibody with alkaline phosphatase by microbial transglutaminase. *Biotechnol Bioeng* **86**: 399-404.
- Tanaka, T., Kamiya, N., Nagamune, T. (2004) Peptidyl linkers for protein heterodimerization catalyzed by microbial transglutaminase. *Bioconj Chem* **15**: 491-497.
- Terskikh, A.V., Le Doussal, J.M., Cramer, R., Fisch, I., Mach, J.P., Kajava, A.V. (1997) "Peptabody": a new type of high avidity binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1663-1668.

- Thornton, J.M. (1981) Disulphide bridges in globular proteins. *J Mol Biol* **151**: 261-287.
- Timasheff, S.N. & Arakawa, T. (1990) Stabilization of Protein Structure by Solvents. In: Creighton TE, ed. *Protein Structure: A Practical Approach*. Oxford University Press
- Tobias, J.W., Shrader, T.E., Rocap, G., Varshavsky, A. (1991) The N-end rule in bacteria. *Science* **254**: 1374-1377.
- Toepert, F., Knaute, T., Guffler, S., Pires, J.R., Matzdorf, T., Oschkinat, H., Schneider-Mergener, J. (2003) Combining SPOT synthesis and native peptide ligation to create large arrays of WW protein domains. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**: 1136-1140.
- Toepert, F., Pires, J.R., Landgraf, C., Oschkinat, H., Schneider-Mergener, J. (2001) Synthesis of an Array Comprising 837 Variants of the hYAP WW Protein Domain This work was supported by the DFG (INK 16/B1-1), by the Fonds der Chemischen Industrie, and by the Universitätsklinikum Charite Berlin. *Angew Chem Int Ed Engl* **40**: 897-900.
- Tripet, B., Yu, L., Bautista, D.L., Wong, W.Y., Irvin, R.T., Hodges, R.S. (1996) Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain off the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. *Protein Eng* **9**: 1029-1042.
- Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L., Rapoport, T.A. (2003) Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J* **22**: 4346-4355.
- Verdecia, M.A., Bowman, M.E., Lu, K.P., Hunter, T., Noel, J.P. (2000) Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat Struct Biol* **7**: 639-643.
- Verma, I.M. & Somia, N. (1997) Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* **389**: 239-242.
- Viguera, A.R., Arrondo, J.L., Musacchio, A., Saraste, M., Serrano, L. (1994) Characterization of the interaction of natural proline-rich peptides with five different SH3 domains. *Biochemistry* **33**: 10925-10933.
- Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., Birnstiel, M.L. (1992) Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7934-7938.
- Walker, J., Crowley, P., Moreman, A.D., Barrett, J. (1993) Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Mol Biochem Parasitol* **61**: 255-264.
- Waragai, M., Junn, E., Kajikawa, M., Takeuchi, S., Kanazawa, I., Shibata, M., Mouradian, M.M., Okazawa, H. (2000) PQBP-1/Npw38, a nuclear protein binding to the polyglutamine tract, interacts with U5-15kD/dim1p via the carboxyl-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* **273**: 592-595.
- Weber, G. (1995) van't Hoff Revisited: Enthalpy of Association of Protein Subunits. *J Phys Chem* **99**: 1052-1059.
- Weiss, E., Chatellier, J., Orfanoudakis, G. (1994) In vivo biotinylated recombinant antibodies: construction, characterization, and application of a bifunctional Fab-BCCP fusion protein produced in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **5**: 509-517.



- Weissenhorn, W., Calder, L.J., Dessen, A., Laue, T., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1997) Assembly of a rod-shaped chimera of a trimeric GCN4 zipper and the HIV-1 gp41 ectodomain expressed in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6065-6069.
- Weissenhorn, W., Carfi, A., Lee, K.H., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1998) Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Mol Cell* **2**: 605-616.
- Wetlaufer, D.B., Saxena, V.P., Ahmed, A.K., Schaffer, S.W., Pick, P.W., Oh, K.J., Peterson, J.D. (1977) Protein thiol-disulfide interchange and interfacing with biological systems. *Adv Exp Med Biol* **86A**: 43-50.
- Wiesner, S., Stier, G., Sattler, M., Macias, M.J. (2002) Solution structure and ligand recognition of the WW domain pair of the yeast splicing factor Prp40. *J Mol Biol* **324**: 807-822.
- Will, C.L. & Luhrmann, R. (1997) Protein functions in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 320-328.
- Williamson, M.P. (1994) The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J* **297 (Pt 2)**: 249-260.
- Willuda, J., Kubetzko, S., Waibel, R., Schubiger, P.A., Zangemeister-Wittke, U., Plückthun, A. (2001) Tumor targeting of mono-, di-, and tetravalent anti-p185(HER-2) miniantibodies multimerized by self-associating peptides. *J Biol Chem* **276**: 14385-14392.
- Wishart, D.S. & Sykes, B.D. (1994) The C-13 Chemical-Shift Index - A Simple Method for the Identification of Protein Secondary Structure Using C-13 Chemical-Shift Data. *Journal of Biomolecular Nmr* **4**: 171-180.
- Woody, R.W. (1993) The Circular-Dichroism of Oriented Beta Sheets - Theoretical Predictions. *Tetrahedron-Asymmetry* **4**: 529-544.
- Woody, R.W. (1994) Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. *Eur Biophys J* **23**: 253-262.
- Woychik, R.P., Maas, R.L., Zeller, R., Vogt, T.F., Leder, P. (1990) 'Formins': proteins deduced from the alternative transcripts of the limb deformity gene. *Nature* **346**: 850-853.
- Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Wiley New York
- Yaffe, M.B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X.Z., Stukenberg, P.T., Rahfeld, J.U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M.W., Fischer, G., Cantley, L.C., Lu, K.P. (1997) Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* **278**: 1957-1960.
- Yagi, R., Chen, L.F., Shigesada, K., Murakami, Y., Ito, Y. (1999) A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *EMBO J* **18**: 2551-2562.
- Yoshitake, S., Yamada, Y., Ishikawa, E., Masseyeff, R. (1979) Conjugation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* and rabbit antibodies using N-hydroxysuccinimide ester of N-(4-carboxycyclohexylmethyl)-maleimide. *Eur J Biochem* **101**: 395-399.
- Zarrinpar, A. & Lim, W.A. (2000) Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition. *Nat Struct Biol* **7**: 611-613.

Zhou, N.E., Kay, C.M., Hodges, R.S. (1992) Synthetic model proteins: the relative contribution of leucine residues at the nonequivalent positions of the 3-4 hydrophobic repeat to the stability of the two-stranded alpha-helical coiled-coil. *Biochemistry* **31**: 5739-5746.

Zhou, N.E., Kay, C.M., Hodges, R.S. (1993) Disulfide bond contribution to protein stability: positional effects of substitution in the hydrophobic core of the two-stranded alpha-helical coiled-coil. *Biochemistry* **32**: 3178-3187.

Zhou, X.Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P.J., Shen, M., Stoller, G., Kullertz, G., Stark, M., Fischer, G., Lu, K.P. (2000) Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell* **6**: 873-883.

---

## VII. Anhang

### VII.1. Übersicht der experimentell bestimmten Molekularmassen

**Tabelle 21:** Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit durch Massenspektrometrie ermittelten Molekulargewichte der N-terminal veränderten Varianten, Cystein-Mutanten, isotopenmarkierten und biotinylierten Abkömmlingen sowie der Fusionsproteine GST-WW und PP-GFP. Die Molekularmassen der prolinreichen Peptide sind Tabelle 2 zu entnehmen. Die Analyse erfolgte routinemäßig im Rahmen der Reinheitskontrolle.

Protein/Assoziat <sup>1</sup>	Theoretische Masse <sup>2</sup> (Da)	Ermittelte Masse <sup>3</sup> (Da)	Abweichung
WW-wt	4322.6	4322.2	<0.01 %
WW-AKSM	4740.1	4739.1	0.02 %
WW- $\Delta ket$	4026.3	4023.3	0.07 %
WW-D24C	4310.6	4310.4	<0.01 %
WW-K35C	4297.5	4297.6	<0.01 %
WW-K35C Dimer	8593.0	8594.0	0.01 %
WW-K35C-PPC2	5548.5	5549.2	0.01 %
WW-K35C-CTR-N	5122.5	5122.9	< 0.01 %
Biotin-WW-wt	4658.1	4657.0	0.02 %
Biotin-WW-D24C	4646.1	4647.8	0.04 %
Biotin-WW-K35C	4633.0	4632.5	0.01 %
<sup>15</sup> N-WW-AKSM	4797	4798	0.02 %
<sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C-WW-AKSM	5000	4999	0.02 %
GST-WW-K35C	30445	30448	0.01 %
C-PP-GFP	29027	29028	<0.01 %

<sup>1</sup> durch Disulfidverbrückung gebildetes Kopplungsprodukt

<sup>2</sup> durchschnittliche Masse der unprotonierten Spezies (*average mass*), lt. 'PeptideMass', [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)

<sup>3</sup> ermittelt durch ESI- bzw. MALDI-TOF-Massenspektrometrie, korrigiert auf unprotonierte Spezies

## VII.2. Dissoziationskonstanten bestimmt für WW-AKSM mit PPN1/PPN2

**Tabelle 22:** Übersicht der durch Fluoreszenztitration ermittelten  $K_D$ -Werte, die den Einfluß von pH, Temperatur und Ionenstärke des Lösungsmittels auf die Bindung von FBP11-WW1 an prolinreiche Leucin-Liganden wiedergeben

pH-Wert		$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ] <sup>1,3</sup>
5.5		537 $\pm$ 76
6.0		526 $\pm$ 31
6.25		472 $\pm$ 31
6.5		430 $\pm$ 31
7		319 $\pm$ 14
7.5		226 $\pm$ 7
8		201 $\pm$ 9
8.5		223 $\pm$ 5
Temperatur		$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ] <sup>2</sup>
[°C]	[K]	
8	281	57 $\pm$ 2
12	285	77 $\pm$ 3
16	289	92 $\pm$ 3
20	293	117 $\pm$ 3
24	297	133 $\pm$ 4
28	301	176 $\pm$ 5
NaCl-Konzentration [M]		$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ] <sup>2,3</sup>
0.01		161 $\pm$ 3
0.15		145 $\pm$ 5
0.3		135 $\pm$ 2
0.5		122 $\pm$ 2
1		94 $\pm$ 2

<sup>1</sup> Dissoziationskonstanten der Bindung von PPN1 an WW-AKSM

<sup>2</sup> Dissoziationskonstanten der Bindung von PPN2 an WW-AKSM

<sup>3</sup> bei 25°C

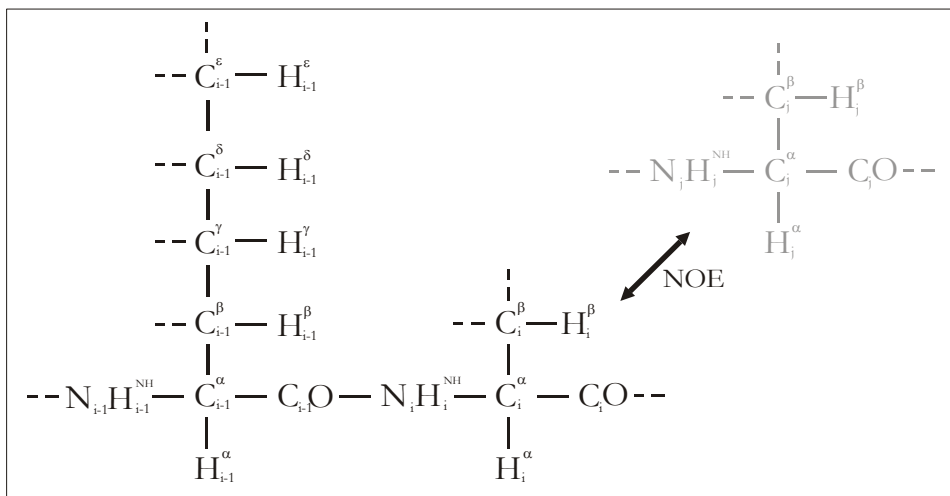
### VII.3. NMR-Strukturstatistik

**Tabelle 23:** Übersicht der NMR-Struktur-Parameter von freier WW-Domäne sowie des Komplexes aus FBP11-WW1 und PPN4 (Abschnitt III.2)

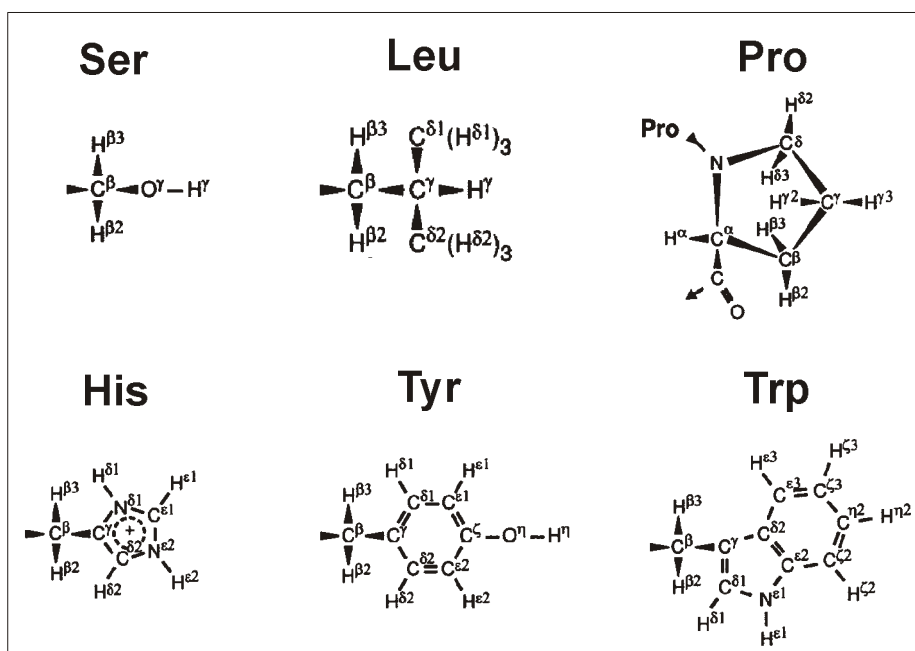
Art und Anzahl der NOE/Distanzlimits ( <i>restraints</i> )	freie WW-Domäne	WW/PPN4-Komplex
intraresiduell	230	203
sequenziell	134	109
<i>medium range</i>	70	45
<i>long range</i>	210	150
intermolekular	-	40
Wasserstoffbrücken (jeweils 2 NOE)	11	14
Dihedralwinkel ( $\phi, \psi$ )	28	40
uneindeutig	342	215
Gesamtanzahl	1041	830
<b>Mittlere Abweichung (rmsd) von experimentellen Distanzlimits</b>		
NOE (Å)	$0.07 \pm 0.01$	$0.04 \pm 0.01$
Dihedralwinkel (°)	$2.2 \pm 0.3$	$0.7 \pm 0.1$
<b>CNS Potentialenergien (kcal/mol)</b>		
$E_{\text{total}}$	$390 \pm 11$	$359 \pm 12$
$E_{\text{bonds}}$	$7.3 \pm 0.9$	$3.5 \pm 0.4$
$E_{\text{anglesl}}$	$48 \pm 6$	$29 \pm 2$
$E_{\text{impropers}}$	$8 \pm 1$	$5.2 \pm 0.7$
$E_{\text{dihedral}}$	$165 \pm 19$	$236 \pm 4$
$E_{\text{vdW}}$	$65 \pm 6$	$49 \pm 4$
$E_{\text{NOE}}$	$88 \pm 10$	$34 \pm 9$
$E_{\text{cdih}}$	$9 \pm 3$	$2.1 \pm 0.6$
<b>Mittlere Abweichung (rmsd) des NMR-Ensembles<sup>1</sup> von der gemittelten Struktur (Å)</b>		
<b>bzgl. WW-Domänen-Aminosäuren (S15-P42)</b>		
Peptidrückgrat	$0.25 \pm 0.09$	$0.34 \pm 0.06$
Gesamtstruktur (außer Wasserstoff)	$0.69 \pm 0.07$	$0.83 \pm 0.11$
<b>bzgl. WW-Domänen- (S15-P42) und Liganden-Aminosäuren (P5'-P10')</b>		
Peptidrückgrat	-	$0.32 \pm 0.05$
Gesamtstruktur (außer Wasserstoff)	-	$0.77 \pm 0.10$

<sup>1</sup> repräsentative Auswahl der 15 energieärmsten Strukturen

## VII.4. Atomnomenklatur ausgewählter Aminosäuren



**Abbildung 70:** Allgemeine Atombezeichnungen am Beispiel von zwei aufeinanderfolgenden Aminosäuren (i-1) und (i) sowie der Aminosäure (j) in räumlicher Nähe von (i). NOE werden zwischen Protonen beobachtet, die bis zu 5 Å voneinander entfernt sein können, aber nicht zu benachbarten Aminosäuren gehören müssen (Pfeilmarkierung). Sie basieren auf der abstandsabhängigen Spindiffusion zwischen in räumlicher Nähe befindlichen Protonen und sind das wichtigste Element bei der Strukturaufklärung durch NMR-Spektroskopie.



**Abbildung 71:** Atombezeichnung der Seitenketten ausgewählter Aminosäuren, auf die sich u.a. bei der Zuordnung der NOE bezogen wurde (Abschnitt III.2.4, nach Wüthrich, 1986). Die Atome des Peptidrückgrates sind nicht dargestellt ( $C_\alpha$ ,  $NH$ ,  $CO$ ).

## VII.5. RP-HPLC-Retentionszeiten der Kopplungsspezies

**Tabelle 24:** Retentionszeiten der Spezies bei der analytischen RP-HPLC-Auftrennung (Abschnitt II.10.7)

Ligand	Retentionszeiten Peakspitze [min] <sup>1</sup>				
	Monomer <sup>2</sup>	Monomer-GS <sup>3</sup>	Dimer <sup>4</sup>	Komplex WW-K35C <sup>5</sup>	Komplex WW-D24C <sup>5</sup>
PPC1	19.0	18.0	29.0	22.0	22.0
PPC2	25.0	23.5	33.0	26.5	25.0
PPC3	28.5	26.0	36.0	28.5	-
PPC4	19.0	17.5	26.5	23.2	21.5
PPC5	18.5	17.0	27.0	23.0	-
PPC6	21.0	18.5	29.0	24.0	-
PPC7	19.0	-	25.0	23.0	21.0
PPC8	18.5	-	26.5	23.0	21.0
PPC9	18.5	-	26.5	22.5	21.0
PPC10	18.5	16.5	26.0	22.5	21.0
CTR-N	14.5	13.5	24.0	22.0	-
WW-Variante	Monomer <sup>2</sup>	Monomer-GS <sup>3</sup>	Dimer <sup>4</sup>		
WW-K35C	18.5	16.5	20.5		
WW-D24C	17.0	15.5	18.5		

<sup>1</sup> ± 0.5 min Abweichung

<sup>2</sup> Cystein liegt reduziert vor

<sup>3</sup> gemischtes Disulfid mit Glutathion

<sup>4</sup> Homodimer, disulfidverbrückt über Cystein

<sup>5</sup> disulfidverbrückter Komplex aus Ligand und WW-Domäne

## VII.6. Verwendete Abkürzungen und englische Fachbegriffe

bp	Basenpaare
CD	Circulardichroismus
CspA	<i>Cold Shock Protein A</i>
CTD	carboxyterminale Domäne der eukaryontischen RNA-Polymerase II
<i>distance restraint</i>	NMR-Distanzlimit
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DTNB	5, 5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ESI	<i>Electro spray ionization</i>
EVH1	<i>Enabled VASP Homology 1 domain</i>
FBP	<i>Formin Binding Protein</i>
FMOC	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GSH	Glutathion, reduziert ( $\gamma$ -Glutamylcysteinylglycin)
GSSG	Glutathion, oxidiert
GST	Glutathion-S-Transferase
HFIP	Hexafluorisopropanol
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IMAC	Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatografie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
LLO	Listeriolysin O
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight</i>
NEDD4	<i>Neuronal precursor cell Expressed Developmentally Downregulated 4</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>Nuclear-Overhauser-Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear-Overhauser-Effect-Spectroscopy</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	<i>postsynaptic density/ disc-large/ ZO1 domain</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PP	Polyprolin, bzw. prolinreiches Peptid
PTB	Phosphotyrosin-bindende Domäne
rmsd	<i>root mean square deviation</i>
RP-HPLC	<i>Reversed Phase HPLC</i>
scFv	<i>single chain Fv-Fragment</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH2(3)	<i>Src Homology 2(3) domain</i>
SMCC	Succinimidyl-4-(N-maleidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat
SPDP	N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin
TFA	Trifluoressigsäure
VASP	<i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
VLP	<i>virus like particle</i>
VP1	Polyoma Virushüllprotein 1
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
WBP	<i>WW domain binding protein</i>
wt	Wildtyp
WW	zwei (namensgebende) Tryptophanreste (Einbuchstabencode: W)
YAP	<i>Yes kinase associated protein</i>



## Danksagung

*An dieser Stelle sei allen Leuten gedankt, die am Entstehen und Fortgang dieser Arbeit Anteil hatten.*

*Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph möchte ich herzlich für die Vergabe des Themas, seine Unterstützung sowie für zahlreiche Ideen und Vorschläge danken, die ich vermutlich nicht immer quantitativ befolgt habe, die mir aber an so mancher Stelle weitergeholfen haben.*

*Prof. Dr. José Ricardo Pires danke ich für die Durchführung der NMR-Messungen, die Auswertung und Bereitstellung der Strukturdaten sowie für den regen wissenschaftlichen Austausch auf dem (langen) Weg zur Struktur...*

*Ein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. habil. Hauke Lilie, der mir jederzeit sein biophysikalisches Ohr und Auge geliehen hat und damit nicht selten den Fortgang meiner Arbeit katalysieren konnte. Neben zahlreichen konstruktiven Vorschlägen, Hilfestellung bei den Simulationen und der kritischen Durchsicht meiner Dissertationsschrift verdanke ich ihm auch Einblicke in die geheimnisvolle Welt der Redoxchemie...*

*Bei Prof. Dr. Hartmut Oschkinat möchte ich mich für die freundliche Unterstützung im Rahmen der NMR-Untersuchungen sowie die Bereitstellung ausreichender Mengen <sup>13</sup>C-Glucose bedanken.*

*Dipl.-Biochemiker Dirk Wildemann, Dr. Frank Bordusa und Dr. Sven Rothmund danke ich für die Bereitstellung zahlreicher synthetischer Peptide bzw. für die Unterstützung und Hilfestellung bei der Herstellung und Reinigung.*

*Frau Dr. Angelika Schierborn und Dr. Marc Kipping danke ich für die Durchführung zahlloser massenspektrometrischer Analysen...*

*Bei Dr. Gerald Böhm und Dr. Uli Schmidt möchte ich mich für die Betreuung und Unterstützung in der ersten Zeit meiner Promotion bedanken.*

*Prof. Dr. Milton T. Stubbs danke ich für Geduld und Unterstützung in den letzten Monaten selbiger...*

*Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Proteintechnologie am Institut für Biotechnologie gilt mein Dank für die Schaffung einer angenehmen und kreativen Arbeitsatmosphäre, in der ich mich sehr wohlfühlt habe. Ein besonderer Dank geht an dieser Stelle an Frau Weichelt, die stets ein offenes Ohr für "ihre Kinder" hat und mit Rat und Tat zur Seite steht.*

*In bester Erinnerung wird mir "die Gruppe" bleiben, deren Gesellschaft ich - über die Mittagsgemeinschaft hinaus - in den vergangenen Jahren sehr genossen habe und mir eine stetige Quelle der Aufmunterung und Erbeiterung war. Meinen Gruß und Dank hiermit an: Christiane, Conny, Hilmar, Jan und Antje sowie Alfred, Doreen, Susi und Roman.*

*Antje danke ich nicht nur für das Korrekturlesen dieser Arbeit...*

*...und meiner Familie bin ich dankbar für uneingeschränkten Rückhalt und Unterstützung in meinem Leben.*



# Lebenslauf

## Zur Person

Christoph Parthier  
Fischer-von-Erlach-Str. 77  
06114 Halle (Saale)  
geboren am 29.5.1973  
in Halle (Saale)  
ledig

## Ausbildungsweg

- 09/79 - 07/89 Besuch der Polytechnischen Oberschule „Wittekind“ in Halle (Saale)
- 09/89 - 08/91 Besuch der Erweiterten Oberschule „Thomas Müntzer“ in Halle (Saale),  
Abitur 08/91, Durchschnittsnote: 1,1
- 10/91 - 09/92 Beginn des Studiums der Biochemie an der Martin-Luther-Universität  
Halle (Saale) (2 Semester)
- 11/92 - 01/94 Ableistung des Zivildienstes an der Seniorenberatungsstelle der Stadt  
Halle (Saale)
- 03/94 - 06/94 Aufenthalt in der Schweiz, Biochemiestudium an der Universität Zürich  
(1 Semester)
- 10/94 - 09/98 Fortsetzung des Biochemiestudiums an der Martin-Luther-Universität  
Halle (Saale) (8 Semester)  
Abschluss des Studiums 09/98 als Diplom-Biochemiker, Thema der  
Diplomarbeit: „*Charakterisierung der C2C12-Muskelzelllinie: Analyse der  
Genexpression durch Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)*“,  
Note „Sehr gut“
- 10/98 - 04/99 Arbeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biotechnologie  
der Martin-Luther-Universität Halle (Saale)
- seit 05/99 Aufenthalt als wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Institut  
für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle (Saale),  
Anfertigung der vorliegenden Promotionsarbeit



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich mich bisher mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe. Ich versichere weiterhin, daß die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegeben Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Halle (Saale), den 08.10.2004