

*Charakterisierung von Einzelbindungs-Konformationsänderungen in  
Polypeptiden durch chemische Modifikation und Enzymkatalyse*

**Dissertation**



zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

vorgelegt der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher-Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Diplom-Biochemiker Dirk Wildemann  
geb. am: 28.06.1973 in Wernigerode

Halle/Saale, Juni 2004

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. Fischer      Max-Planck-Forschungstelle für Enzymologie der  
Proteinfaltung, Halle/Saale
2. Prof. Dr. K. Neubert      Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-  
Universität Halle
3. Prof. Dr. T. Kiefhaber      Biozentrum der Universität Basel, Schweiz

Datum der Verteidigung: 16.11.2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000007737**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007737>]

## Inhaltsverzeichnis

|           |                                                                                                                                        |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung</b>                                                                                                                      | 1  |
| <b>2.</b> | <b>Thioxozeptidbindungen als photoschaltbares Element modifizierter Ribonuklease S</b>                                                 | 7  |
| 2.1       | Ribonuklease S                                                                                                                         | 7  |
| 2.2       | Eigenschaften der Thioxozeptidbindung                                                                                                  | 11 |
| 2.3       | Biochemische Auswirkungen der Thioxoamidsubstitution                                                                                   | 20 |
| 2.4       | Spektroskopische Eigenschaften der Thioxozeptidbindung                                                                                 | 23 |
| 2.5       | Thioxozeptidbindungen als photoschaltbares Element der Konformation von Peptiden                                                       | 24 |
| 2.6       | Thioxozeptide als Synthons für die Herstellung modifizierter Peptide                                                                   | 26 |
| 2.7       | Synthese thioxylierter Oligozeptide                                                                                                    | 27 |
| 2.8       | Ergebnisse und Diskussion                                                                                                              | 33 |
| 2.8.1     | Eine neue Strategie zur Festphasensynthese von Thioxozeptiden                                                                          | 33 |
| 2.8.1.1   | Suche nach geeigneten Schutzgruppen und polymeren Trägern                                                                              | 33 |
| 2.8.1.2   | Synthese $N^\alpha$ -Fmoc- geschützter Amino-thioxo-carbonsäure-6-nitrobenzotriazolide (Fmoc-Xaa- $\Psi$ [CS-N]-NBt)                   | 41 |
| 2.8.1.3   | Synthese thioxylierter S-Peptid-Derivate                                                                                               | 44 |
| 2.8.2     | Charakterisierung der S-Peptid/S-Protein-Interaktion in thioxylierten Derivaten der RNase S mittels isothermer Titrationskalorimetrie  | 48 |
| 2.8.3     | Enzymkinetische Charakterisierung thioxylierter Derivate der RNase S                                                                   | 51 |
| 2.8.4     | Diskussion der Ergebnisse                                                                                                              | 57 |
| 2.8.5     | CD-spektroskopische Untersuchungen                                                                                                     | 68 |
| 2.8.6     | Thioxozeptidbindungen als photoschaltbare Sonde der Konformation des S-Peptids und der Aktivität der [ThioxoAla <sup>4</sup> ]-RNase S | 71 |
| 2.8.6.1   | Photoinduzierte <i>cis/trans</i> -Isomerisierung der amidischen Thioxozeptidbindung                                                    | 71 |
| 2.8.6.2   | Photoinduzierte <i>cis/trans</i> -Isomerisierung der Thioxozeptidbindung des [ThioxoAla <sup>4</sup> ]-S-Peptids                       | 73 |
| 2.8.6.3   | Einfluss der photoinduzierten <i>cis/trans</i> -Isomerisierung auf die Aktivität der [ThioxoAla <sup>4</sup> ]-RNase S                 | 76 |

|           |                                                                                                                                               |     |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>3.</b> | <b>Pin1-katalysierte Einzelbindungs-Konformationsänderungen in der Embryogenese von <i>Xenopus laevis</i></b>                                 | 80  |
| 3.1       | Ser(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )/Thr(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )-Pro- spezifische PPIasen                                            | 80  |
| 3.2       | Entwicklung und Charakterisierung Pin1-spezifischer Inhibitoren                                                                               | 87  |
| 3.3       | Biologische Tests                                                                                                                             | 101 |
| 3.4       | Diskussion                                                                                                                                    | 106 |
| <b>4.</b> | <b>Zusammenfassung</b>                                                                                                                        | 113 |
| <b>5.</b> | <b>Material und Methoden</b>                                                                                                                  | 116 |
| 5.1       | <b>Thioxylierte Derivate der RNase S</b>                                                                                                      | 116 |
| 5.1.1     | Synthese thioxylierter S-Peptide                                                                                                              | 116 |
| 5.1.2     | Enzymkinetische Messungen                                                                                                                     | 120 |
| 5.1.3     | Isotherme Titrationskalorimetrie                                                                                                              | 122 |
| 5.1.4     | Photoinduzierte <i>cis/trans</i> -Isomerisierung des [ThioxoAla <sup>4</sup> ]-S-Peptids                                                      | 122 |
| 5.1.5     | Einfluss der photoinduzierten <i>cis/trans</i> -Isomerisierung auf die Aktivität der [ThioxoAla <sup>4</sup> ]-RNase S                        | 123 |
| 5.2       | <b>Pin1-spezifische Inhibitoren</b>                                                                                                           | 124 |
| 5.2.1     | Synthesen                                                                                                                                     | 124 |
| 5.2.2     | Suche nach hochaffinen Pin1-Liganden durch Screening einer Bibliothek Cellulose-gebundener Phosphopeptide                                     | 125 |
| 5.2.3     | PPIase-Tests                                                                                                                                  | 125 |
| 5.2.4     | “Far-Western-Blot“-Analysen zum Nachweis der selektiven Bindung von Peptid 15 durch die PPIase-Domäne des <i>hPin1</i>                        | 127 |
| 5.2.5     | Charakterisierung der Peptid 17/ <i>hPin1</i> -Interaktion mittels ITC                                                                        | 127 |
| 5.2.6     | Analyse der Stabilität von Peptid 17 mittels Kapillarelektrophorese                                                                           | 128 |
| 5.2.7     | Zellkultur und Gewinnung von HeLa-Zell- und <i>X. laevis</i> Embryo-Lysat                                                                     | 128 |
| 5.2.8     | Nachweis der Bindung von Peptid 16 durch authentisches Pin1 aus <i>X. laevis</i> Embryonen ( <i>XlPin1</i> ) und HeLa-Zellen ( <i>hPin1</i> ) | 128 |
| 5.2.9     | Einfluss von Peptid 17 auf die Interaktion zwischen MPM-2-Antigenen und <i>hPin1</i>                                                          | 129 |
| 5.2.10    | Mutagenese, Klonierung und Überexpression rekombinanter Proteine                                                                              | 129 |
| 5.2.11    | Mikroinjektion und Fluoreszenzfärbung                                                                                                         | 130 |

|           |                             |     |
|-----------|-----------------------------|-----|
| <b>6.</b> | <b>Analytische Daten</b>    | 131 |
| <b>7.</b> | <b>Literaturverzeichnis</b> | 135 |

## Abkürzungsverzeichnis

|            |                                                                                 |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Abz        | 2-Aminobenzoesäure                                                              |
| ACN        | Acetonitril                                                                     |
| Aib        | Aminoisobuttersäure (2-Amino-2-methyl-propansäure)                              |
| 2',3'-cCMP | zyklisches Cytidin-2',3'-monophosphat                                           |
| Cyp18      | Cyclophilin 18                                                                  |
| DAPI       | 4',6-Diamidino-2-phenylindol                                                    |
| DBU        | 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en                                               |
| DCM        | Dichlormethan                                                                   |
| DEPC       | Diethylpyrocarbonat                                                             |
| DIC        | Diisopropylcarbodiimid                                                          |
| DIPEA      | <i>N,N</i> -Diisopropyl-ethylamin                                               |
| DMF        | <i>N,N</i> -Dimethylformamid                                                    |
| DTT        | 1,4-Dithio-threit (1,4-Dimercapto-2,3-butandiol)                                |
| EDT        | Ethandithiol                                                                    |
| EDTA       | Ethylendiamintetracetat (Kaliumsalz)                                            |
| EGTA       | Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure             |
| ESI        | Elektronenspray-Ionisation                                                      |
| FKBP       | FK506-bindendes Protein                                                         |
| GST        | Glutathion-S-transferase                                                        |
| HATU       | <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat |
| Hepes      | <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure              |
| HOAT       | <i>N</i> -Hydroxy-7-Azabenzotriazol                                             |
| HOBT       | 1-Hydroxy-benzotriazol                                                          |
| IPTG       | Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid                                    |
| MALDI-ToF  | Matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry    |
| MES        | Morpholino-ethansulfonsäure                                                     |
| MS         | Massenspektrometrie                                                             |
| NH-Np      | Np bedeutet 4-Nitrophenyl (NH-Np entspricht pNA: para-Nitroanilid)              |

|                |                                                                                                                                                                                                       |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NMI            | <i>N</i> -Methyl-imidazol                                                                                                                                                                             |
| NMM            | <i>N</i> -Methyl-morpholin                                                                                                                                                                            |
| NP-40          | Nonidet <sup>®</sup> P40 (NonylPhenyl-Polyetherglucose)                                                                                                                                               |
| Pbf            | 2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzo-5-sulfonyl                                                                                                                                                         |
| pGlu           | Pyroglutaminsäure                                                                                                                                                                                     |
| Pip            | Piperidin                                                                                                                                                                                             |
| Pmc            | 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl                                                                                                                                                               |
| POD            | Peroxidase (Meerrettich)                                                                                                                                                                              |
| PyBOP          | (Benzotriazol-1-yl-oxy)-tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat                                                                                                                                  |
| PyNOP          | (6-NitroBenzotriazol-1-yl-oxy)-tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat                                                                                                                           |
| RP-HPLC        | Reverse-phase high performance liquid chromatography                                                                                                                                                  |
| RT             | Raumtemperatur                                                                                                                                                                                        |
| RT-PCR         | “Reverse Transcriptase”-PCR                                                                                                                                                                           |
| TFA            | Trifluoressigsäure                                                                                                                                                                                    |
| TFMSA          | Trifluormethansulfonsäure                                                                                                                                                                             |
| THF            | Tetrahydrofuran                                                                                                                                                                                       |
| Tis            | Triisopropylsilan                                                                                                                                                                                     |
| t <sub>R</sub> | HPLC-Retentionszeit                                                                                                                                                                                   |
| Trt            | Trityl                                                                                                                                                                                                |
| V5             | Peptidsequenz aus einem Hüllprotein des SV40-Virus (GKIPNPLLGLDST), erleichtert die Reinigung eines rekombinaten Proteins (Affinitätschromatographie unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers) |
| Z              | Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe                                                                                                                                                                        |