

## Protein-Protein-Wechselwirkungen

## Architektur von Protein-Ligand-Bindungsstellen durch templatassiierte intramolekulare Peptid-Peptid-Interaktionen\*\*

Chao Yu, Miroslav Malesevic, Günther Jahreis,  
Mike Schutkowski, Gunter Fischer\* und  
Cordelia Schiene-Fischer

Grundlegende Prozesse in der belebten Natur basieren auf Protein-Peptid- oder Protein-Protein-Interaktionen. Dabei bestimmen diskontinuierlich angeordnete Polypeptidsegmente in den Proteinen sowohl die Spezifität als auch die Freie Energie der Komplexbildung.<sup>[1]</sup> Für die Charakterisierung

von Polypeptidsegmenten, die zur Ligandbindung beitragen, benötigt man aufwändige Untersuchungsmethoden wie multidimensionale NMR-spektroskopische Methoden, Kristallstrukturanalyse oder „phage-displayed shotgun scanning“.<sup>[2]</sup>

Wir präsentieren hier eine einfache Methode, die auf der Basis von Sequenzinformationen ein niedrig aufgelöstes, dreidimensionales Bild von Protein-Protein- oder Protein-Peptid-Interaktionsstellen liefert. Dazu haben wir eine Bibliothek von kurzkettigen Oligopeptiden aus den Sequenzen der interagierenden Moleküle abgeleitet und durch Spotting als intramolekular angeordnete, templatfixierte Peptidpaare auf eine Cellulosemembran aufgetragen. Zur Anwendung kamen dabei typische Strategien zur Spot-Synthese<sup>[3]</sup> an bifunktionellen Templaten und Interaktionsanalysen für die Matrix-gebundenen Peptidpaare. Wir nennen diese Kombination IANUS-Spot-Array (IANUS: induced organization of structure by matrix-assisted togetherness). Die auf einer Cellulosemembran fixierten IANUS-Spots bestehen aus jeweils zwei Peptidblöcken: Der erste Peptidblock ist ein innerhalb des Spot-Arrays unveränderlicher Block eines Liganden, der sich entweder vom Peptidteil eines Protein-Peptid-Komplexes ableitet oder aus einem interagierenden Segment eines Protein-Protein-Komplexes besteht. Der zweite Peptidblock besteht aus einer die gesamte Proteinsequenz des bindenden Proteins umfassenden Bibliothek von überlappenden, gleich langen Peptiden. Nach der Synthese erhält man einen Spot-Array, der die gesamte Kollektion der Bindungsmotive enthält, die die Architektur der Interaktionsstellen des entsprechenden Protein-Ligand-Komplexes bilden.

In wässriger Lösung liegen kurze Peptide als ein Ensemble sich schnell ineinander umwandelnder Konformere vor. Diese Molekülkollektion enthält alle Strukturelemente, die spezifisch für jeden Typ von Peptid-Peptid-, Peptid-Protein- oder Peptid-Kontaktstellen-Interaktionen sind.<sup>[4]</sup> Wenn Peptidketten aufgrund ihrer Anordnung konformativ stark eingeschränkt sind, kann dies zur bevorzugten Population von interaktionstypischen Konformationen führen (konformative Induktion). Typische Einschränkungen für IANUS-Spot-Arrays sind templatassiierte, intramolekulare Interaktionen in den IANUS-Peptidpaaren, hohe effektive Kettenkonzentrationen durch die Intramolekularität und eine Mikroumgebung mit herabgesetzter Polarität. Die durch das Templat erzwungene und von der Cellulosematrix unterstützte Nahanordnung (Togetherness) der Peptidketten könnte zur Bevorzugung attraktiver Konformationen führen, wenn das IANUS-Peptidpaar Sequenzbereiche umfasst, die aus den Interaktionsstellen eines Protein-Peptid- oder Protein-Protein-Komplexes abgeleitet sind.


IANUS-Spots mit einem intramolekular interagierenden Peptidpaar lassen sich anhand ihrer Eigenschaften von Spots mit Peptidpaaren, die sich von Peptidsegmenten außerhalb der Bindungsregionen ableiten, unterscheiden. Der Peptidligand in einem Protein-Peptid-Komplex wird abhängig von seiner Bindungsaffinität typischerweise mehr oder weniger stark maskiert, sodass intermolekulare Erkennungsreaktionen negativ ausfallen. Diese Maskierung kann man auch für ein IANUS-Peptidpaar erwarten, wenn es nativ-ähnliche, intramolekulare Interaktionen miteinander eingeht; nichtin-

[\*] Dr. C. Yu,<sup>[+]</sup> Dr. M. Malesevic, Dr. G. Jahreis, Dr. M. Schutkowski,<sup>[++]</sup> Prof. G. Fischer, Dr. C. Schiene-Fischer  
Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung  
Weinbergweg 22, 06120 Halle/Saale (Deutschland)  
Fax: (+49) 345-551-1972  
E-mail: fischer@enzyme-halle.mpg.de

[+] Gegenwärtige Adresse: Nuffield Department of Clinical Medicine  
John Radcliff Hospital  
Headington, Oxford, OX3 9DU (Großbritannien)

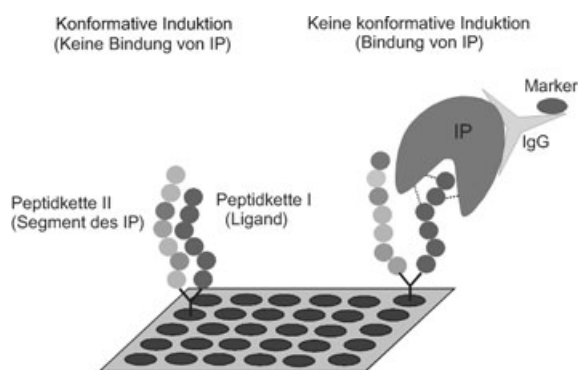
[++] Gegenwärtige Adresse: Jerini AG  
Invalidenstraße 130, 10115 Berlin (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 610) und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

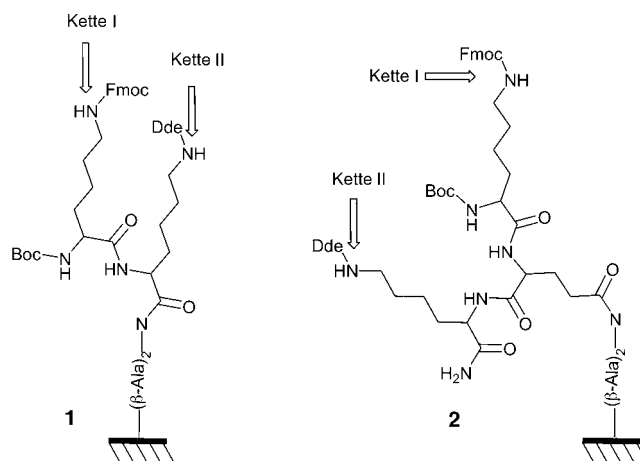
teragierende IANUS-Peptidpaare lassen dagegen den Peptidliganden unmaskiert. Die so resultierenden, unterschiedlichen Bindungseigenschaften für ein extern angebotenes, lösliches Protein ermöglichen das Auslesen des IANUS-Spot-Arrays und den Nachweis für das Auftreten konformativer Induktion. Das Ergebnis wäre eine Kollektion all jener Proteinsegmente, die Interaktionsstellen des Protein-Peptid- oder Protein-Protein-Komplexes entsprechen.

Hier wurden die Spots durch die Zugabe eines löslichen Proteins beurteilt, das mit der Proteinkomponente um die Bindung an den Matrix-gebundenen Liganden konkurriert. Nach der Behandlung mit löslichem Protein sollten IANUS-Peptidpaare ein typisches Spot-Muster aufweisen: a) starke Bindung des löslichen Proteins an Spots, die nichtinteragierende Peptidpaare enthalten und b) schwächere Bindung an Spots, in denen der Peptidligand durch konformative Induktion maskiert ist (Abbildung 1).



**Abbildung 1.** Behandlung von Spots mit einem Protein, das mit dem von der Proteinkomponente abgeleiteten Peptidsegment um die Bindung an den Peptidliganden im Peptidpaar konkurriert. Rechts: nicht-interagierende Peptidpaare; starke Bindung des Proteins. Links: Maskierung des Peptidliganden durch konformative Induktion; schwächere Bindung des Proteins. IP: Proteinkomponente des Protein-Ligand-Komplexes, IgG: proteinspezifischer Antikörper.

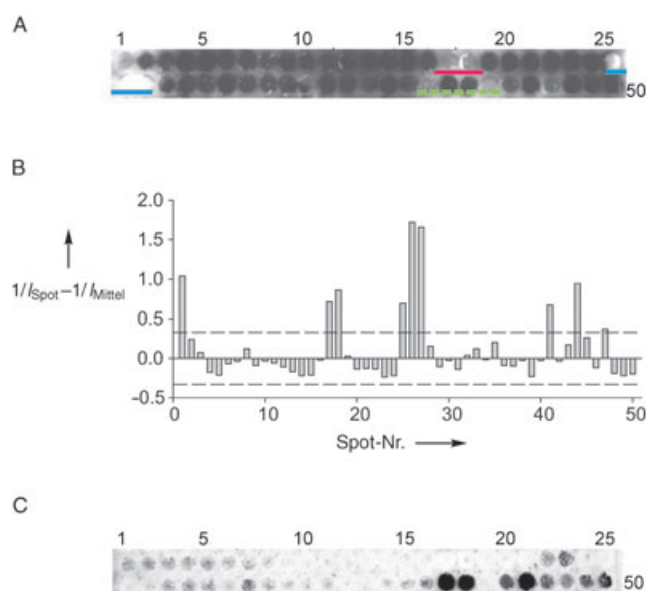
Wir haben eine IANUS-Spot-Analyse am Beispiel des Komplexes aus Streptavidin und Strep-tag II (Stt II) durchgeführt, dessen dreidimensionale Struktur und damit auch die Architektur der Bindungsregion des Liganden in hoher Auflösung bekannt sind. Das homotetramere Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* bildet einen Komplex mit dem 10-meren Stt II (SNWSHPQFEK), das die Biotin-Bindungstasche ausfüllt.<sup>[5]</sup> Unser IANUS-Spot-Array besteht aus einem bifunktionellen Lysyl-Templat, an dem unter Anwendung orthogonaler Schutzgruppenstrategien jeweils ein 12-meres Streptavidin-Peptid und das 10-meres Stt II synthetisiert wurden. Beide Peptide bilden ein IANUS-Peptidpaar, das intramolekular im Molverhältnis 1:1 angeordnet ist. Der Satz überlappender, 12-merer Peptide, der sich über die Sequenz von Streptavidin mit einer Verschiebung von drei Aminosäuren erstreckt und 50 individuelle Spots umfasst, wurde auf der Fmoc-Seite des orthogonal geschützten Templates **1** synthetisiert (Schema 1; Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl). Jeder Spot enthält außerdem Stt II, das auf der Dde-Seite des Templates aufgebaut ist (Dde = 2-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl). Beide Peptide wurden abschließend N-terminal acetyliert.



**Schema 1.** Die Template **1** und **2** sind über einen (β-Ala)<sub>2</sub>-Spacer an die Cellulosemembran gebunden.

Zur Bestimmung der Synthesequalität wurden zunächst in vier repräsentativen, vordefinierten Spots Peptidpaare mit und ohne intramolekulare Interaktionen und einem photolabilen Linker auf der Basis eines 2-Nitrobenzyl-Restes zwischen den Peptidketten und Templat **2** unter Lichtschutz aufgebaut.<sup>[6]</sup> Nach der photolytischen Spaltung wurde eine massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-ToF durchgeführt. Für jeden Spot stimmten die Massen der analysierten Peptide mit den berechneten molekularen Massen überein (siehe Hintergrundinformationen). Der Einfluss des Templates auf die Fähigkeit der IANUS-Peptidpaare zur konformativen Induktion wurde untersucht, indem die an Templat **1** synthetisierten Peptidpaare mit den an **2** synthetisierten verglichen wurden (Schema 1). Für an Templat **2** gebundene IANUS-Peptidpaare überspannte der Streptavidin-Peptidblock aus 12-meren Peptiden (Fmoc-Seite) die Streptavidinsequenz mit einer Verschiebung von zwei Aminosäuren und umfasste 75 individuelle Spots. Zur Detektion der konformativen Induktion wurden die IANUS-Spot-Arrays mit löslichem Streptavidin behandelt; die durch Stt II vermittelte Streptavidinbindung an einen Spot kam nur dann zustande, wenn die Bindungsregion von Stt II nicht durch konformative Induktion im IANUS-Peptidpaar blockiert wurde. Als Ausleseverfahren für die Streptavidinbindung an die IANUS-Spot-Arrays wurde eine standardisierte Westernblot-Analyse verwendet. Im Falle der Synthese an Templat **1** wurde für die Mehrzahl der Spots eine starke Streptavidinbindung detektiert, wobei eine Dunkelfärbung der Spots charakteristisch war. Es wurden jedoch auch zwei Regionen mit schwächeren Streptavidinaffinitäten für zwei oder mehr benachbarte Spots identifiziert, was auf eine Maskierung der Streptavidin-Affinität von Stt II zurückgeführt werden kann (Abbildung 2A, blau und pink unterstrichen). Bedingt durch die Sequenzüberlappung der Streptavidin-Peptide im IANUS-Spot-Array sind nur zwei oder mehr benachbarte IANUS-positive Spots als Anzeichen einer konformativen Induktion zu werten.

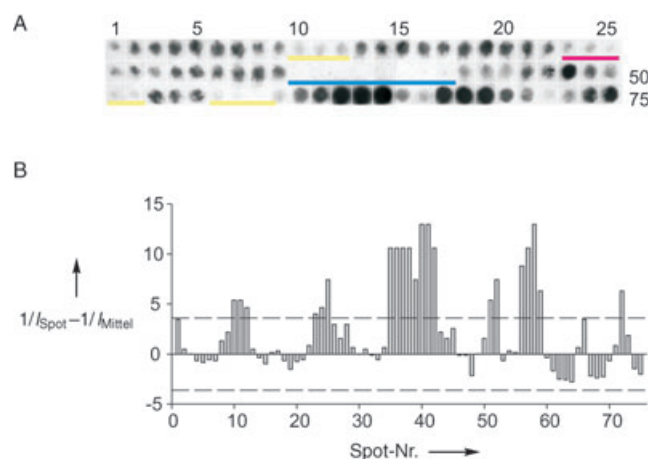
Zusätzlich zur direkten, visuellen Auswertung des IANUS-Spot-Arrays wurden diese als IANUS-positiv bezeichneten Spots durch die Abweichung ihrer reziproken Intensität von der reziproken mittleren Spot-Intensität (Ab-



**Abbildung 2.** Die Bindung von Streptavidin an einen IANUS-Spot-Array aus Streptavidin-Stt-II-Peptidpaaren, gebunden über Templat 1. Überlappende 12-mere Peptide überspannen die Streptavidinsequenz mit einer Verschiebung von drei Aminosäuren. Der Peptid-Scan von Streptavidin wurde an der Fmoc-Seite synthetisiert und Stt II an der Dde-Seite. A) Die Cellulose wurde mit 100 nM löslichem Streptavidin inkubiert, Spot-gebundenes Streptavidin wurde durch Westernblot-Analyse detektiert. B) Densitometrische Analyse von Abbildung 2A. Die Intensität jedes Spots wurde mit einem GS-700-Imaging-Densitometer (Bio-Rad) analysiert ( $I_{\text{Spot}}$ : Spot-Intensität,  $I_{\text{Mittel}}$ : durchschnittliche Intensität aller analysierten Spots). Die grossen positiven Werte entsprechen schwachen Blotsignalen, die als IANUS-positive Spots konformative Induktion im Peptidpaar anzeigen. Die gestrichelte Linie repräsentiert die durch Streuung hervorgerufene Abweichung  $3n$  ( $n$ : mittlere Abweichung der negativen Werte von Null). C) Die Cellulose wurde mit Streptavidin (100 nM) in Gegenwart von Biotin (600 nM) untersucht und das gebundene Streptavidin detektiert.

bildung 2B) identifiziert. Für die Blockierung der Streptavidinbindung an IANUS-positive Spots kann eine konformative Induktion verantwortlich gemacht werden, bei der Interaktionen im IANUS-Peptidpaar auftreten, die typisch für Interaktionen in der Kontaktfläche des Streptavidin-Stt-II-Komplexes sind. Da diese Kontaktflächen die Interaktionsseiten des Komplexes definieren, spiegelt die Gesamtheit aller IANUS-positiven Spots die Architektur der Protein-Ligand-Interaktion wider. Eine Synthese von Stt II an der Fmoc-Seite und der Streptavidinsequenzen an der Dde-Seite verursachte keine wesentliche Veränderung in der Positionierung der IANUS-positiven Spots im IANUS-Spot-Array (siehe Hintergrundinformationen).

Die Verteilung der IANUS-positiven Spots bei Verwendung von Templat 2 und das Spot-Muster, das bei Verwendung von Templat 1 erhalten wurde, waren sich sehr ähnlich (Abbildung 3, blau und pink unterstrichen; Tabelle 1). Die Identifikation von drei zusätzlichen interagierenden IANUS-Peptidpaaren (Abbildung 3, gelb unterstrichen) stützt ein Modell, bei dem die Flexibilität des Templates eine wesentliche Bedeutung für die konformative Induktion hat: Der Linker zwischen den Peptiden ist in Templat 2 um drei kovalente Bindungen länger als der in 1 und erleichtert so die



**Abbildung 3.** Die Bindung von Streptavidin an einen IANUS-Spot-Array aus Streptavidin-Stt-II-Peptidpaaren, gebunden über Templat 2. Überlappende 12-mere Peptide überspannen die Streptavidinsequenz mit einer Verschiebung von zwei Aminosäuren. Der Peptid-Scan von Streptavidin wurde an der Fmoc-Seite synthetisiert und Stt II an der Dde-Seite. A) Die Cellulose wurde mit 100 nM löslichem Streptavidin inkubiert und das gebundene Streptavidin detektiert. B) Densitometrische Analyse. Die Intensität jedes Spots wurde wie in Abbildung 2 B beschrieben analysiert.

konformative Induktion, sodass weitere Streptavidin-Peptide nativ-ähnlich mit Stt II interagieren können. Templat 2 eignet sich daher besser zur Identifizierung aller Streptavidin-Stt-II-Bindungsstellen.

Zwei weitere IANUS-positive Spots (Spots 41 und 44 in Abbildung 2A, grün unterstrichen) zeigen konformative Induktion an, liegen aber als isolierte Spots vor. Wir nehmen an, dass eigentlich ein kontinuierlicher Bereich von vier IANUS-positiven Spots vorliegt (Spots 41–44); der Grund für die Dunkelfärbung der Spots 42 und 43 muss daher erklärt werden: Wie IANUS-Spot-Arrays in Gegenwart des Streptavidin-Liganden Biotin belegen, ist das IANUS-negative Verhalten von Spot 42 und 43 auf die Interaktion zwischen löslichem Streptavidin und den Streptavidin-Peptiden in den IANUS-Peptidpaaren zurückzuführen. Das Streptavidin-Segment um H<sup>127</sup> ist direkt in die Bildung der Streptavidin-Tetramere einbezogen,<sup>[7]</sup> und infolgedessen bleibt lösliches Streptavidin auch dann hochaffin für beide Spots, wenn sein aktives Zentrum durch Biotin blockiert ist. Durch diese Blockade bleiben alle Spots außer den Spots 42/43 und 45/46 in Gegenwart von Biotin ungefärbt (Abbildung 2C). Das Auslesen der IANUS-Spot-Arrays durch Westernblots schränkt also die Aufklärung von Bindungsregionen homologer Proteine ein, weil eine Homooligomerisierung die Detektion von IANUS-positiven Spots verhindert.

Kennt man die hochaufgelöste Struktur eines Protein-Ligand-Komplexes, können die attraktiven Kräfte zwischen Ligand und Protein und damit die Bindungsregion durch einen PMF-Ansatz (PMF = potential of mean force) beschrieben werden. Dabei geht man davon aus, dass H-Brücken, Wassercluster und hydrophobe Interaktionen zur Bindungsenergie beitragen.<sup>[8]</sup> In diesem Modell wird angenommen, dass ein Abstand von 5.0 Å zwischen den Atomen der interagierenden Moleküle alle attraktiven Protein-Ligand-Interaktionen der Bindungskontaktstelle einbezieht.

Wir haben auf dieser Basis alle Streptavidin-Reste innerhalb eines Radius von 5.0 Å um die Atome von Stt II (Tabelle 1) identifiziert, um die dreidimensionale Bindungskontaktstelle des Streptavidin-Stt-II-Komplexes aus der Röntgenstruktur zu erhalten (PDB-Eintrag: 1RSU).<sup>[5a]</sup> Die zwei N-terminalen Reste von Stt II sind in dieser Struktur nicht lokalisiert, sodass die Identifizierung ihrer Kontaktstellen nicht möglich ist. Unsere IANUS-Spot-Arrays liefern dagegen auch diese Interaktionsstellen.

Mit einer Ausnahme, dem Segment Y<sup>43</sup>–E<sup>44</sup>, wurde durch das Auftreten IANUS-positiver Spots die vollständige Bindungsfläche der Streptavidin-Stt-II-Interaktion in den IANUS-Spot-Arrays identifiziert. Das Segment Y<sup>43</sup>–E<sup>44</sup>, in der Nähe des N-Terminus des IANUS-positiven Spots 23 (Tabelle 1), befindet sich innerhalb des 5.0-Å-Radius des Restes Q<sup>7</sup> (Stt II), ergibt aber keinen IANUS-positiven Spot. Wesentlich ist allerdings, dass der IANUS-Spot-Array keine falschpositiven Signale liefert, sodass nur tatsächlich interagierende Proteinsegmente als Teil der Bindungsfläche detektiert wurden.

Entscheidend für das Auftreten einiger IANUS-positiver Spots war allein das Vorhandensein von entweder D<sup>128</sup>, W<sup>79</sup> oder R<sup>84</sup> im Peptidpaar (Tabelle 1, Nr. 41–44, 25–27, 35–42, 56–59). Der dominierende Charakter dieser Aminosäuren macht deutlich, dass manchmal nur ein begrenzter struktureller Kontext für das Auftreten konformativer Induktion erforderlich ist. Diese Ausnahmestellung scheint mit besonders starken Interaktionskräften verbunden zu sein, denn im Falle von D<sup>128</sup> und R<sup>84</sup> wurden außergewöhnlich starke H-Brücken zu Stt II beschrieben.<sup>[5a]</sup> Für die meisten der IANUS-positiven Spots findet man allerdings einen ausgedehnten Bindungsbereich mit multiplen Interaktionen zwischen dem Streptavidin-Peptid und Stt II (Tabelle 1, Nr. 17–18, 25–27, 23–25, 10–12, 51–52). Wir konnten somit den diskontinuierlichen Aufbau der Interaktionsfläche des Streptavidin-Stt-II-Komplexes durch IANUS-Spot-Arrays nachweisen und die Interaktionsmodule einzeln identifizieren.

**Tabelle 1:** IANUS-positive Streptavidinsequenzen und die aus der Röntgenstruktur abgeleiteten Streptavidin-Stt-II-Kontaktregionen (fett).<sup>[a]</sup>

Spot-Nr.	IANUS-positives Streptavidin-Segment
Templat 1	
17–18	<sup>49</sup> NA <b>ESRY</b> VLGTGRYDSA <sup>63</sup>
25–27	<sup>73</sup> LGWTV <b>AWKNNYRNAHSAT</b> <sup>90</sup>
41–44 <sup>[b],[c]</sup>	<sup>121</sup> KSTLVGHDTFTKVKPSAASID <sup>141</sup>
Templat 2	
23–25	<sup>45</sup> SAVGNA <b>ESRY</b> VLGTGRY <sup>60</sup>
35–42	<sup>69</sup> SGTALGWTV <b>AWKNNYRNAHSAT</b> TWGS <sup>94</sup>
10–12	<sup>19</sup> GTWYN <b>QLGST</b> FIIVTAG <sup>34</sup>
51–52	<sup>101</sup> EARINT <b>QWLLTSGT</b> <sup>114</sup>
56–59 <sup>[c]</sup>	<sup>111</sup> TSGTTEANAWKSTLVGHDT <sup>128</sup>

[a] Die Aminosäurereste (fett gedruckte Buchstaben) befinden sich in einer Kugel mit einem Radius von 5.0 Å um die Atome von Stt II im Streptavidin-Stt-II-Komplex (PDB-Eintrag: 1RSU). [b] Es wurde ein kontinuierlicher Bereich von vier IANUS-positiven Spots angenommen (siehe Text). [c] Über die Kontaktstellen für diese Bereiche von Streptavidin sind nur begrenzte Informationen erhältlich, resultierend aus der schlecht definierten Lokalisation der Atome entweder der Streptavidinsequenz S<sup>136</sup>–Q<sup>159</sup> oder der Stt-II-Reste (S<sup>1</sup> und N<sup>2</sup>) in der Röntgenstruktur.

Führt man Substitutionsanalysen für einzelne Positionen eines IANUS-positiven Peptidpaars durch, zeigt sich die Spezifität der Methode (siehe Hintergrundinformationen). Die Positionen 53 (Arg) und 54 (Tyr) des Streptavidin-Peptids <sup>49</sup>NAESRYVLGTGRY<sup>60</sup> wurden in einem IANUS-Spot-Array gegen alle genkodierte Aminosäuren ausgetauscht, während Stt II nicht verändert wurde. Die Substitution in Position 53 führte in den meisten Fällen zu IANUS-negativen Spots. IANUS-positiv-positive Spots wurden in dieser Position nur mit K, Q, Y und V erhalten. In Position 54 führten mit der Ausnahme von E, V und N alle genkodierte Aminosäuren zu IANUS-positiven Spots. Die Substitutionsanalyse von Stt II in den Positionen 5 (His) und 9 (Glu) wurde durchgehend unter Verwendung des Streptavidin-Peptids <sup>75</sup>VAWKNNYRNAHS<sup>88</sup> durchgeführt. Stt II ist allerdings nicht nur der Interaktionspartner im Peptidpaar, sondern fungiert durch die Bindung von löslichem Streptavidin zugleich als Sonde zur Detektion der IANUS-positiven Spots. Es zeigte sich, dass die meisten Stt-II-Varianten nicht in der Lage sind, mit nativem Streptavidin zu interagieren; sie verhindern damit eine Diskriminierung zwischen IANUS-positiven und IANUS-negativen Spots. Ein IANUS-positiver Spot wurde im Falle einer E<sup>9</sup>-Variante beobachtet, die durch die konservative Substitution die Bindung von Streptavidin und damit die Detektion des IANUS-Spots ermöglichte (siehe Hintergrundinformationen).

Tabelle 1 fasst die Sequenzbereiche von Streptavidin zusammen, die über den IANUS-Spot-Array die Architektur der Bindungsfläche des Streptavidin-Stt-II-Komplexes beschreiben, und setzt dies in Relation zu der aus der Röntgenstruktur ableitbaren Bindungsfläche. Die Länge der Erkennungssequenzen der Streptavidin-Peptide für Stt II ist unterschiedlich – dies spiegelt sich auch in einem IANUS-Spot-Array wider, bei dem die IANUS-Peptidpaare die reverse Streptavidin-Sequenz, gelesen vom C-terminalen Ende des Proteins her, enthalten. IANUS-positiv-positive Spots wurden mit reversen Streptavidin-Peptiden erhalten, die die Aminosäurereste D<sup>128</sup>, W<sup>79</sup> und R<sup>84</sup> enthielten. In Anbetracht der sehr flexiblen Templatstrukturen und der teilweise sehr kurzen Erkennungssequenzen in diesen Peptidsegmenten können Konformationen mit der normalen Sequenzorientierung auch in den aus den reversen Sequenzen aufgebauten Peptidpaaren enthalten sein (siehe Hintergrundinformationen).

Die Rolle der templatunterstützten Orientierung von Proteinfragmenten wurde bereits mithilfe zweier verwandter experimenteller Ansätze untersucht. Zum Konzept der templatassoziierten synthetischen Proteine (TASPs)<sup>[9]</sup> und der modularen Assemblierung von helicalen Peptiden auf einem cyclischen Peptid-Templat zur Konstruktion von synthetischen funktionalen, Häm-bindenden Vier-Helix-Bündel-Proteinen gibt es eine Reihe von Untersuchungen.<sup>[10]</sup> Eine ähnliche Methode wird verwendet, um die Phosphorylierung von S<sup>383</sup> in Elk-1, die durch die Elk-docking-Domäne vermittelt wird, Spot-gestützt zu identifizieren; diese Methode nutzt die Zufallsverteilung zweier Peptidstränge auf einer Spotfläche bei der Synthese an einem monofunktionalen Linker.<sup>[11]</sup> In all diesen Fällen findet man nativ-ähnliche Anordnungen der Peptidketten, die auf konformativer Induktion der Matrix-fixierten Oligopeptide basieren könnten.



Der hier beschriebene IANUS-Spot-Array benötigt zur Detektion der konformativen Induktion in den Peptidpaaren eine Probe des nativen Streptavidins. Diese experimentelle Einschränkung des IANUS-Peptid-Arrays kann vermieden werden, wenn die Interaktion in den Peptidpaaren direkt auf der für den Array benutzten Membran messbar ist. So zeigten vom Streptavidin-Stt-II-Komplex abgeleitete IANUS-Peptidpaare mit Streptavidin-Peptiden, die N-terminal eine Dansyl-Gruppe tragen, und Stt II, das N-terminal mit Fluorescein markiert ist, eine hohe Fluoreszenzintensität bei 510–530 nm, wenn im Westernblot ein IANUS-positiver Spot identifiziert wurde (Dansyl = 5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonyl). Für IANUS-negative Spots, deren Peptidpaare durch die fehlende konformative Induktion flexibler sein müssen, ist diese Fluoreszenz effizient gelöscht. In Gegenwart von Biotin ist die Fluoreszenz der IANUS-positiven Spots auf das Niveau der IANUS-negativen Spots abgesenkt, was auf eine Konkurrenz zwischen Biotin und Stt II um das Streptavidin-Peptid mit der interaktiven Konformation im IANUS-Peptidpaar hinweist (siehe Hintergrundinformationen). Die Nahordnung der Ketten des Peptidpaares in IANUS-positiven Spots wird durch Biotin aufgehoben, wobei sich das Fluoreszenzsignal durch einen effizienteren Löschvorgang abschwächt. Auf diese Weise ist es also möglich, die konformative Induktion in IANUS-Peptidpaaren proteinfrei und empfindlich zu detektieren. Mit diesem Verfahren können IANUS-Spot-Arrays nicht nur zur Aufklärung der Architektur von Protein-Ligand-Kontaktbereichen beitragen, sondern sie sind auch leistungsfähige Werkzeuge für die Suche nach Inhibitoren und Effektoren, und das ausschließlich auf der Basis von Sequenzinformationen. Auf native Proteine muss man bei dieser Methode nicht zurückgreifen.

Eine neue Strategie, die auf der konformativen Induktion komplementärer molekularer Oberflächen von Peptidpaaren beruht, hat ein komplettes, niedrig aufgelöstes Bild der Kontaktregionen des Streptavidin-Stt-II-Komplexes geliefert, das nahezu vollständig mit den Kontaktbereichen übereinstimmt, die aus der Röntgenstruktur zugänglich sind. Prinzipiell können mit Fluoreszenzmarkierungen versehene IANUS-Peptid-Arrays Informationen zur Architektur der Bindungsregionen liefern, auch wenn als Grundlage nur die Primärstruktur der interagierenden Polypeptide zur Verfügung steht. Die Probe eines nativen Proteins ist nicht mehr erforderlich.

### Experimentelles

Peptidsynthese: Templat **1** wurde durch die schrittweise Kupplung von Fmoc-Lys(Dde)-OH und Boc-Lys(Fmoc)-OH an einen ( $\beta$ -Ala)<sub>2</sub>-Spacer in die Cellulosemembran eingeführt. Die Aminosäuren wurden unter Nutzung von einer zur Aminosäure äquimolaren Menge an Kupplungsreagens PyBOP und von zwei Äquivalenten DIEA als Base in DMF aktiviert (PyBOP = Benzotriazol-1-yloxytrypyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat, DIEA = Diisopropylethylamin). Templat **2** wurde durch Festphasensynthese an Rink-amid-MBHA-Harz erzeugt (MBHA = 4-Methylbenzhydrylamin). Nach der Synthese erfolgte die Abspaltung von Fmoc-Glu-Lys(Dde)-CONH<sub>2</sub> vom Harz durch TFA (Trifluoressigsäure). Fmoc-Glu-Lys(Dde)-CONH<sub>2</sub> wurde über die  $\gamma$ -Carboxygruppe der Glutaminsäure mit der für Templat **1** beschriebenen Kupplungsprozedur an einem ( $\beta$ -Ala)<sub>2</sub>-Spacer verankert. Nach Ende der Synthese

von Templat **2** durch Kupplung von Boc-Lys(Fmoc)-OH wurden die freien Amino- und Hydroxypositionen mit 5 % Ac<sub>2</sub>O und 2 % DIEA in DMF für 1 h blockiert. Nachfolgend wurden die Peptidketten nach Standardvorschriften für die Spot-Synthese synthetisiert.<sup>[3a]</sup> Nach Entfernung der Dde-Schutzgruppe mit 2-proz. Hydrazin-Lösung in DMF konnte die zweite Kette synthetisiert werden.

MALDI-ToF: Teile der Peptidspots (4 mm<sup>2</sup>; Nr. 22, 29, 39 und 40 in Tabelle 1; Abbildung 3) wurden 2 min mit UV-Licht bestrahlt. Im Anschluss wurde eine Lösung von  $\alpha$ -Cyan-4-hydroxymethylsäure in Acetonitril/Wasser (0.1 % TFA) direkt auf die Spots gegeben und bei Raumtemperatur getrocknet. MALDI-ToF-MS wurde mit den getrockneten Spots an einem Bruker-Reflex-II-Massenspektrometer gemessen (Bruker Daltonik GmbH, Bremen).

Westernblots: Die trockenen Cellulosemembranen wurden 10 min in Methanol und 3  $\times$  20 min in TBS-Puffer (30 mM Tris/HCl, pH 7.6, 170 mM NaCl, 6.4 mM KCl) gespült. 100 mM Streptavidin in MP-Puffer (30 mM Tris/HCl, pH 7.6, 170 mM NaCl, 6.4 mM KCl, 0.05 % Tween, 20.5 % Sucrose) wurden mit den Membranen über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Ungebundenes Streptavidin wurde durch Waschen mit TBS-Puffer (4 °C) entfernt, an die Spots gebundenes Protein wurde auf Nitrocellulosemembranen (0.45  $\mu$ m, PALL Gelman) unter Verwendung einer Semi-dry-Blot-Apparatur (Biometra) elektrotransferiert. Die Nitrocellulosemembranen wurden zwischen Blot-Papier gelagert, das mit Transfer-Puffer (25 mM Tris/HCl, pH 8.3, 150 mM Glycin, 10 % Methanol, 4 °C) getränkt war. Der Elektrotransfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von 0.8 mA cm<sup>-2</sup> in einem optimierten Zeitregime (erster Elektrotransferschritt 30–45 min, zweiter Elektrotransferschritt 60–90 min), transferiertes Streptavidin wurde mittels Anti-Streptavidin-Antikörpern aus Kaninchen (Sigma-Aldrich) und Peroxidase-gekuppelten Anti-Kaninchen-IgG nachgewiesen. Die Visualisierung erfolgte über ein ECL-System. Die densitometrische Analyse wurde an einem GS-700-Imaging-Densitometer (Bio-Rad) ausgeführt.<sup>[12]</sup>

Eingegangen am 16. Juni 2004,  
veränderte Fassung am 4. Oktober 2004  
Online veröffentlicht am 21. Januar 2005

**Stichwörter:** Kombinatorische Chemie · Konformative Induktion · Peptide · Spot-Synthese

- [1] a) P. F. Cook, J. S. Blanchard, W. W. Cleland, *Biochemistry* **1988**, 27, 4853–4858; b) Y. Chen, D. Xu, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2003**, 4, 159–181.
- [2] a) S. W. Homans, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 292–303; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 290–300; b) Z. Dauter, V. S. Lamzin, K. S. Wilson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 681–688; c) S. K. Avrantinis, R. L. Stafford, X. Tian, G. A. Weiss, *ChemBioChem* **2002**, 3, 1229–1234.
- [3] a) R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, 48, 9217–9232; b) M. Lebl, *Biopolymers* **1998**, 47, 397–404; c) A. Kramer, U. Reineke, L. Dong, B. Hoffman, U. Hoffmüller, D. Winkler, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, *J. Pept. Res.* **1999**, 51, 319–327; d) H. Wenschuh, R. Volkmer-Engert, M. Schmidt, M. Schulz, J. Schneider-Mergener, U. Reineke, *Biopolymers* **2000**, 55, 188–206; e) R. Frank, *J. Immunol. Methods* **2002**, 267, 13–26.
- [4] E. T. Kaiser, F. J. Kezdy, *Science* **1984**, 223, 249–255.
- [5] a) T. G. M. Schmidt, J. Koepke, R. Frank, A. Skerra, *J. Mol. Biol.* **1996**, 255, 753–766; b) L. A. Klumb, V. Chu, P. S. Stayton, *Biochemistry* **1998**, 37, 7657–7663; c) I. P. Korndörfer, A. Skerra, *Protein Sci.* **2002**, 11, 883–893; d) S. Freitag, I. Le Trong, L. Klumb, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, *Protein Sci.* **1997**, 6, 1157–1166; e) A. Chilkoti, P. H. Tan, P. S. Stayton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 1754–1758; f) S. Freitag, I. Le Trong, A. Chilkoti, L. A. Klumb, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, *J. Mol. Biol.* **1998**, 279, 211–221.

- [6] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091–2158.
- [7] G. O. Reznik, S. Vajda, C. L. Smith, C. R. Cantor, T. Sano, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1007–1011.
- [8] L. Jiang, Y. Gao, F. Mao, Z. Liu, L. Lai, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2002**, *46*, 190–196.
- [9] a) M. Mutter, P. Dumy, P. Garrouste, C. Lehmann, M. Mathieu, C. Peggion, S. Peluso, A. Razaname, G. Tuchscherer, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1588–1591; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1482–1485; b) S. Peluso, P. Dumy, C. Nkubana, Y. Yokokawa, M. Mutter, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7114–7120.
- [10] H. K. Rau, N. DeJonge, W. Haehnel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11526–11531.
- [11] X. Espanel, S. Walchli, T. Ruckle, A. Harrenga, M. Huguenin-Reggiani, R. H. van Huijsduijnen, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 15162–15167.
- [12] S. Rüdiger, B. Bukau, *Biospektrum* **1998**, *4*, 35–37.