

**Synthetische und theoretische Methoden zur
Bestimmung korrelierter Dynamiken in
Miniproteinen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereichs Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

PHILIP HORX, M.Sc.

aus Wolfen

Marburg an der Lahn, 2021

Erstgutachter: Prof. Dr. ARMIN GEYER

Zweitgutachter: Prof. Dr. OLALLA VÁZQUEZ

Hochschulkenziffer: 1180

Dissertation eingereicht am: 26.05.2021 Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2021

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am: 30.06.2021

Erstgutachter: Prof. Dr. ARMIN GEYER

Zweitgutachter: Prof. Dr. OLALLA VÁZQUEZ

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2021

Hochschulkennziffer: 1180

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2016 bis Dezember 2020 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. ARMIN GEYER.

Mein besonderer Dank gilt

Prof. Dr. ARMIN GEYER

für die große wissenschaftliche Freiheit, die ausgezeichnete Unterstützung und Betreuung bei der Erforschung dieser vielseitigen Thematik. Dadurch wurde mir die Möglichkeit gegeben, mich sowohl in Bereichen Synthese und Analytik als auch in Moleküldynamik-Simulationen weiterzuentwickeln.

Kurzzusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der korrelierten Dynamik verschiedener bioorganischer Systeme mit unterschiedlichen Zeitskalen, wobei sowohl synthetische als auch analytische und theoretische Methoden zum Einsatz kamen. Zunächst wurde die Charakteristik der Bewegung eines dimeren Tetradisulfid beschrieben. Zuvor durchgeführte experimentelle Studien postulierten eine gerichtete Scharnierbewegung der V-förmigen Struktur, die sich aus zwei β -*hairpin*-Motive zusammensetzt und als kodierbare Dimerisierungsdomäne verwendet wurde. NMR-Strukturberechnungen, gefolgt von MD-Simulationen erlaubten die initiale Erfassung der Gesamtdynamik. Die dominanten Bewegungen, das Öffnen und Schließen sowie die Verdrillung der β -*hairpins* wurden durch Hauptkomponentenanalyse identifiziert. Um das begrenzte *sampling* zu überwinden, wurden kollektive Variablen in Analogie zu den Hauptkomponenten ausgewählt, die anschließend in einer *wt*-Metadynamik zur Beschleunigung der Simulation eingesetzt wurden. Die daraus resultierende freie Energiefläche erlaubte die Identifikation eines Bewegungsmechanismus für das Scharnier-Peptid. Neben der Charakterisierung der Dynamik des isolierten Scharnier-Peptids, wurde dieses Strukturmotiv in einer Proteinumgebung, dem vier-Helix-Bündel betrachtet. Anschließend wurde die Dynamik des hydrophoben Kerns eines Zinkfingerpeptides durch eine Kombination aus experimentellen und theoretischen Methoden untersucht. Strukturberechnungen und MD-Simulationen enthüllten eine eingeschränkte Rotation des zentralen Phenylalanins um χ_2 , die dennoch die Ausbildung eines AA'BB'C-Spin-Systems im NMR-Spektrum erlaubt. Um die Orientierung des Phenyls im hydrophoben Kern präzise beschreiben zu können, wurden Tolylyl/Xylyl-Derivate synthetisiert, die zum Symmetriebruch der Rotation führten. Dieses Methyl-Hüpfen um den aromatischen Ring zeigte, dass ϵ -Substitutionen zum Ausfrieren der Dynamik führten, während Modifikationen der δ -Position eine eingeschränkte Rotation erlaubten. Das Energieprofil konnte erneut durch Metadynamiken erhalten werden und steht in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen. Abschließend wurde die Dynamik von β,β -Diaryl- α -Aminosäurehybriden untersucht. NMR-Spektroskopische Studien lieferten Hinweise für eine abhängige Rotation der Seitenketten, dem sogenannten *gearing*. Die Kombination aus MD-Simulation und Metadynamiken enthüllte zwar eine Erhöhung der Energiebarriere im Vergleich zu den entsprechenden natürlichen Aminosäurevorläufern, jedoch verhindert die geringe Verzahnung der aromatischen Ringe kontinuierliches *gearing*. Stattdessen konnte der Zahnradschlupf als dominierende Bewegungsform identifiziert werden. Auf der Basis von *ab initio* Berechnungen wurden Substitutionsmuster innerhalb der Seitenkette postuliert, die nicht nur eine adäquate Energiebarriere und Verzahnung für molekulares *gearing* besitzen, sondern auch synthetisch zugänglich wären. Die vorliegende Arbeit liefert entscheidende Beiträge zur Charakterisierung korrelierter Dynamiken von bioorganischen Systemen und erweitert somit die Grundlagen zum gezielten Designen von Strukturmotiven.

Abstract

The purpose of the present work was to elucidate the correlated dynamics of various bioorganic systems with different time scales, using synthetic as well as analytical and theoretical methods. First, the characteristics of the motions of a dimeric tetradisulfide were established. Previous experimental studies postulated a directional hinge motion of the V-shaped structure composed of two β -hairpin motifs. NMR structure calculations followed by MD simulations allowed the initial capture of the overall dynamics. The dominant motions, opening and closing and twisting of the β -hairpins, were identified by principal component analysis. To overcome the limited sampling, collective variables were selected in analogy to the principal components and subsequently used in a wt-metadynamics to accelerate the exploration of the conformational space. The resulting free energy surface permitted the identification of a mechanism for the hinge-type motion. In addition to characterizing the dynamics of the isolated hinge peptide, this structural motif was simulated in a protein environment, the four-helix bundle. In the second chapter, the hydrophobic core dynamics of a zinc finger peptide was investigated by a combination of experimental and theoretical methods. Structure calculations and MD simulations revealed a restricted rotation of the central phenylalanine around χ_2 , which nevertheless allowed the formation of an AA'BB'C spin system in the NMR spectra. In order to accurately describe the orientation of the phenyl in the hydrophobic core, tolyl/xylyl derivatives were synthesized that led to a symmetry breaking of the degenerate rotation. This methyl hopping around the aromatic ring highlighted that ϵ -substitutions led to a single orientation, while modifications on the δ -position allowed a restricted rotation. The energy profile was again obtained by metadynamics and is in good agreement with the experimental results. Finally, the dynamics of β,β -diaryl- α -amino acids hybrids was investigated. NMR spectroscopy provided evidence for a dependent rotation of the side chains the so-called gearing. The combination of MD simulation and metadynamics revealed an increase in the energy barrier compared to the corresponding natural amino acid precursors, but the low interlocking of the aromatic rings prevented continuous gearing. Instead, gear slip was identified as the dominant form of motion. Based on ab initio calculations, substitution patterns within the side chain were postulated that not only feature adequate energy barriers and interlocking suitable for gearing but would also be synthetically accessible. The present work provides significant contributions for the characterization of correlated dynamics of bioorganic systems and thus extends the foundation for targeted design of structural motifs.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder befinden sich in Begutachtung:

- L. Nicke, **P. Horx**, K. Harms, A. Geyer:
Directed C(sp³)-H Arylation of Tryptophan: Transformation of the Directing Group into an Activated Amide
Chem. Sci. **2019**, *10*, 8634-8641. DOI: 10.1039/C9SC03440D.
- **P. Horx**, A. Geyer
Defining the mobility range of a hinge-type connection using molecular dynamics and metadynamics
PLoS One, **2020**, *15*, e0230962. DOI: 10.1371/journal.pone.0230962.
- **P. Horx**, A. Geyer
Comparing the hinge-type mobility of natural and designed intermolecular bi-disulfide domains
Frontiers in Chemistry, **2020**, *8*, 25. DOI: 10.3389/fchem.2020.00025.
- L. Nicke, **P. Horx**, R. Mueller, S. Els-Heindl, A. Geyer
Tryptophan Analogues with Fixed Side-Chain Orientation: Expanding the Scope
ChemBioChem, **2021**, *22*, 330-335. DOI: 10.1002/cbic.202000424.
- **P. Horx**, A. Geyer
High fice! Methyl probes at five ring positions of phenylalanine explore the hydrophobic core dynamics of zinc finger miniproteins

Teile dieser Arbeit wurden bereits bei den folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

- L. Nicke, **P. Horx**, A. Geyer
Vortrag: "*Gearing up for Binding: β,β -Diaryl- α -Amino-Acids*"
Max-Bergmann-Kreis, **2019**, Grudlsee.
- **P. Horx**, L. Nicke, A. Geyer
Vortrag: "*Enhanced Sampling of Peptide Hairpin Loops to Map out Unusual Folds and Functions*"
Gordon Research Conference: Chemistry and Biology of Peptides, **2020**, Ventura, CA (USA).

Martin Karplus had a green laser.

Arieh Warshel had a red laser.

And I have a blue laser.

MICHAEL LEVITT

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Beziehung von Struktur und Dynamik in biologischen Systemen | 1 |
| 1.2 Miniproteine - ein historisches Abbild | 7 |
| 1.3 Zinkfingerproteine..... | 11 |
| 1.3.1 Entdeckung und historische Bedeutung | 11 |
| 1.3.2 Das Strukturmotiv von Cys ₂ His ₂ -Zinkfingerpeptiden..... | 12 |
| 1.3.3 Metallabhängige Faltung von Zinkfingerproteinen..... | 15 |
| 1.3.4 Zinkfingerpeptide in Gegenwart von weiteren Metall-Ionen | 17 |
| 1.3.5 Intrinsische Beweglichkeit in Zinkfingern..... | 19 |
| 1.3.6 Biologisch relevante Prozesse von Zinkfingern - DNA-Bindung und Protein-Protein- Interaktionen. | 21 |
| 1.4 Kovalente Verknüpfung in biologischen Makromolekülen - die Disulfidbrücke..... | 23 |
| 1.5 NMR-Spektroskopie als Methode zur Strukturbestimmung | 26 |
| 1.6 Computergestützte Simulation von Moleküldynamiken | 29 |
| 1.6.1 Historischer Abriss | 29 |
| 1.6.2 Kraftfelder – Rahmenbedingung zur Beschreibung von atomaren Interaktionen..... | 32 |
| 1.6.3 Verfügbare Zeitskalen in klassischen MD-Simulationen..... | 34 |
| 1.7 Spezielle Techniken einer MD-Simulation..... | 35 |
| 1.7.1 Enhanced Sampling Methoden | 35 |
| 1.7.2 Metadynamik – präzise Manipulation von einzelnen Parametern..... | 36 |
| 1.7.3 Die Qual der Wahl von kollektiven Variablen..... | 37 |
| 1.7.4 Hauptkomponentenanalyse..... | 39 |
| 2. Aufgabenstellung | 42 |
| 3. Ergebnisse und Diskussion..... | 45 |
| 3.1 Charakterisierung der Dynamik eines dimeren Tetradisulfids - verdient es den Namen Scharnier- Peptid?..... | 45 |
| 3.1.1 Generierung einer Startstruktur | 45 |
| 3.1.2 Die Wahl des passenden Kraftfeldes | 47 |

| | |
|--|-----|
| 3.1.3 Charakterisierung der Dynamik von Scharnier-Peptiden durch Moleküldynamik-Simulationen | 50 |
| 3.1.4 Die Limitation der Moleküldynamik-Simulation..... | 54 |
| 3.1.5 Betrachtung der Energiefläche eines Scharnier-Peptids..... | 58 |
| 3.1.6 Kriterien für die Konvergenz der <i>well-tempered</i> Metadynamik..... | 62 |
| 3.1.7 Alternative kollektive Variablen..... | 66 |
| 3.1.8 Beeinflussung der Beweglichkeit von Scharnier-Peptiden | 68 |
| 3.1.9 Parallele vs. Antiparallele Scharniere | 75 |
| 3.2 Charakterisierung der Dynamik des hydrophoben Kerns von Zinkfingerproteinen durch synthetische Modifikationen und computergestützte Simulationen | 81 |
| 3.2.1 Einleitung – Das Zinkfingerpeptid als Miniprotein | 81 |
| 3.2.2 Modifikationen außerhalb des hydrophoben Kerns - Vorarbeiten | 83 |
| 3.2.3 Erstellung eines Strukturbilds der Zinkfingervariante-1 | 86 |
| 3.2.4 Charakterisierung der Rotationsbewegung von Phe ¹³ | 90 |
| 3.2.5 Lösungsansatz des unzureichenden <i>samplings</i> – Metadynamiken im Zinkfingermotiv | 95 |
| 3.2.6 Mechanismus der Rotation von Phe ¹³ in Zinkfingerpeptiden..... | 98 |
| 3.2.7 Manipulation der Rotationsdynamik durch Modifikationen des hydrophoben Kerns | 102 |
| 3.2.8 Aufbrechen der natürlichen Limitationen durch synthetische Aminosäuren..... | 105 |
| 3.2.9 Systematisches Methyl- <i>Hopping</i> am Phe ¹³ in Zinkfingerpeptiden - ϵ oder ζ ? | 109 |
| 3.2.10 Systematisches Methyl- <i>Hopping</i> am Phe ¹³ in Zinkfingerpeptiden - die δ -Position..... | 115 |
| 3.2.11 Der Einfluss von doppelten Modifikationen des aromatischen Ringsystems | 120 |
| 3.2.12 Moleküldynamik-Simulationen von Zinkfingerpeptiden mit modifiziertem hydrophoben Kern..... | 126 |
| 3.2.13 Beeinflussung der Rotationsdynamik des zentralen Phenylrings durch symmetrische Modifikationen | 133 |
| 3.2.14 Die geringe Toleranz von synthetischen Aminosäuren mit doppelter Modifikation der ϵ -Position in Zinkfingerpeptiden - Der Xme-Baustein | 136 |
| 3.2.15 Charakterisierung von symmetrischen δ -Modifikationen des zentralen Phenylrings in Zinkfingerpeptiden | 138 |
| 3.3 Korrelierte Dynamik von β,β -Diaryl- α -Aminosäurehybriden..... | 143 |
| 3.3.1 Einleitung | 143 |

| | |
|---|-----|
| 3.3.2 Die Flexibilität von β,β -Diaryl- α -Aminosäurehybriden auf Bausteinebene..... | 144 |
| 3.3.3 Theoretische Untersuchungen zu denkbaren Diarylaminosäurehybriden mit <i>gearing</i> -Effekt | 147 |
| 3.3.4 Dynamisches Verhalten von β,β -Diarylaminosäurehybriden innerhalb eines Hexapeptids | 151 |
| 4. Zusammenfassung..... | 153 |
| 5. Summary..... | 157 |
| 6. Ausblick..... | 160 |
| 7. Experimenteller Teil..... | 164 |
| 7.1 Allgemeine Anmerkungen..... | 164 |
| 7.2 Synthese von Aminosäurebausteinen | 168 |
| 7.3 Zinkfingerpeptide..... | 200 |
| 7.4 Allgemeine Anmerkungen zu den theoretischen Methoden | 245 |
| 8. Literaturverzeichnis..... | 265 |
| Abkürzungsverzeichnis | 280 |
| Danksagung..... | 283 |
| Lebenslauf..... | 287 |
| Erklärung..... | 288 |

1. Einleitung

1.1 Beziehung von Struktur und Dynamik in biologischen Systemen

Dynamische Bewegungsabläufe, wie das Öffnen einer Bindungstasche in einem Protein, oder das Strecken einer Feder, nehmen eine zentrale Rolle für die Funktion der jeweiligen Systeme ein. Sowohl makroskopische als auch mikroskopische Strukturen weisen bezüglich ihrer Dynamik ähnliche Charakteristika auf. Neben der bereits erwähnten spezifischen Bewegung, die die Funktion des Systems maßgeblich beeinflusst, können unspezifische Bewegungen wie die vereinzelte Rotation einer Seitenkette in einem Protein auftreten, die nur einen geringen Einfluss auf die Gesamtdynamik ausüben. Ein großer Unterschied zwischen den Strukturen liegt in der Zeitspanne, in der diese Prozesse ablaufen können. Die Bewegungen von mechanischen Bauteilen finden in einem Bereich von Millisekunden bis Sekunden statt. Dagegen verfügen bioorganische Makromoleküle über einen enormen Zeitrahmen. Während die Schwingung einer einzelnen Bindung innerhalb von wenigen Pikosekunden abläuft, benötigen manche Proteine Minuten, um ihre vollständige Struktur auszubilden (Abbildung 1).^[1] Die große Bandbreite ermöglichte die Entwicklung von komplexen experimentellen und theoretischen Analysemethoden, wodurch die Dynamik dieser Verbindungen präzise charakterisiert werden kann.

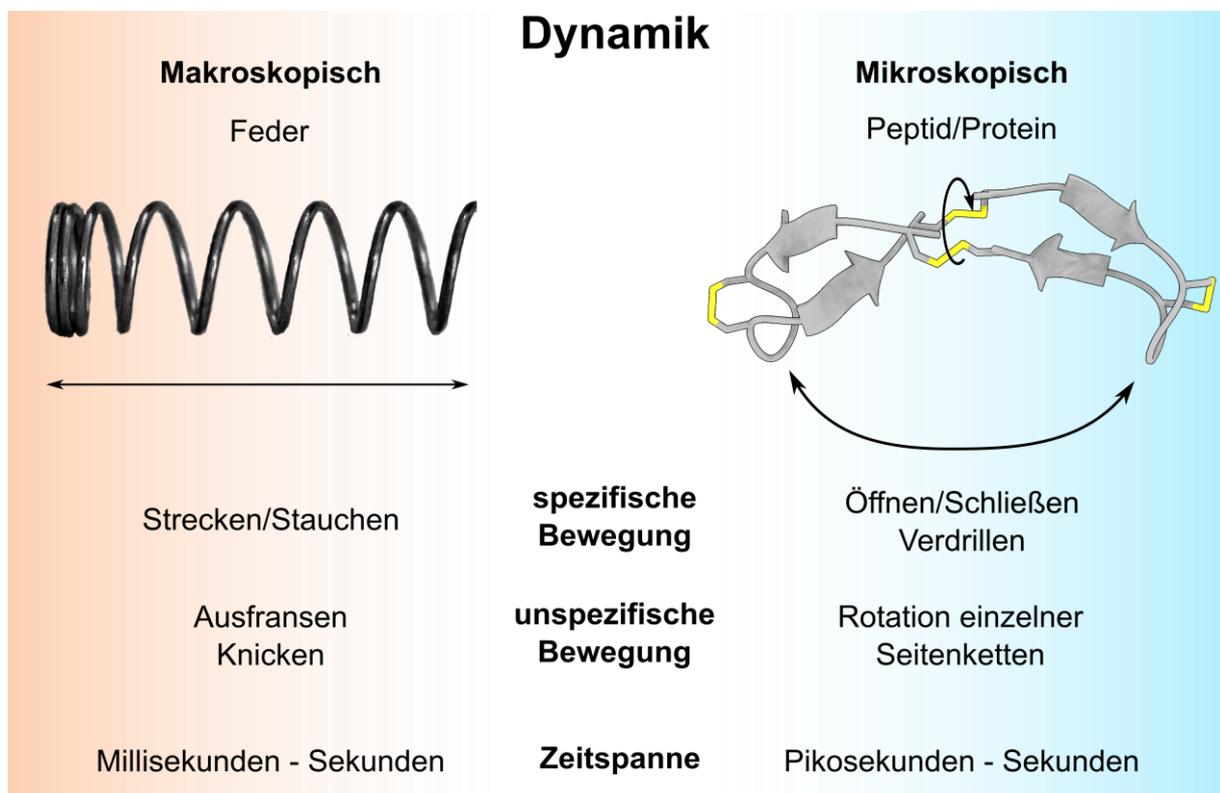


Abbildung 1: Zentrales Thema dieser Arbeit - die Dynamik von bioorganischen Systemen. Das makroskopische Pendant enthält im Bezug zur Dynamik die gleichen Charakteristika. Hervorzuheben ist hierbei die Diskrepanz in der verfügbaren Zeitspanne. Während die schnellsten Bewegungen von Proteinen innerhalb von Pikosekunden ablaufen, kann die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur mehrere Sekunden dauern. Der mechanischen Komponente steht indes nur ein Zeitrahmen von Millisekunden bis Sekunden zur Verfügung.

Wie auch bei mechanischen Einheiten, wird die Dynamik eines Proteins maßgeblich durch seine dreidimensionale Struktur bestimmt, die wiederum durch die Primärstruktur, also der Abfolge der

Aminosäuren innerhalb der Sequenz definiert ist.^[2] Im Jahre 1955 führte SANGER *et al.* die erste vollständige Sequenzierung zur Bestimmung der Primärstruktur eines Proteins, dem Insulin, durch, wofür ihm bereits 1958 der Nobelpreis in Chemie verliehen wurde.^[3,4] Die kurze Zeitspanne zwischen Entdeckung und Anerkennung dieser Arbeit demonstriert die Bedeutung, die diese Entdeckung für die chemische Wissenschaft hatte. Heutzutage gehört die Proteinsequenzierung zu einer der klassischen Analysetechniken der Biochemie, hat jedoch nichts an ihrer Bedeutung verloren. Die verschiedenen Strukturelemente eines Proteins wurden nach LINDERSTRØM-LANG in vier, allgemein anerkannte, Kategorien unterteilt.^[5] Dabei definiert die erste und zugleich simpelste Unterteilung die Aminosäuresequenz als Primärstruktur und bestimmt dessen Struktur und Funktionsweise (Abbildung 2). Wichtige Vorarbeiten zur Beschreibung der Primärstruktur wurden bereits 1951 von PAULING und COREY durch Kristallstrukturanalysen von Aminosäuren und einfachen linearen Peptiden geleistet und zeigten, dass die Amidbindung durch ihrem partiellen Doppelbindungscharakter planar ist und eine signifikante Rolle bei der Stabilität von Proteinen einnimmt.^[6] Die Sekundärstruktur beschreibt die lokale drei-dimensionale Anordnung im Peptidrückgrat und kann durch die Winkel ϕ , ψ und ω beschrieben werden. Letzteres beschreibt die Ausrichtung der Amidbindung, die durch den partiellen Doppelbindungscharakter stark eingeschränkt ist und daher nur Werte von 0° oder 180° einnehmen kann.^[5] Auch ϕ , definiert durch $C_{i-1}-N_i-C\alpha_i-C_i$ und ψ , $N_i-C\alpha_i-C_i-N_{i+1}$ zeigen eingeschränkte Beweglichkeiten, die in Korrelation zur entsprechenden Sekundärstruktur steht. Diese strukturbezogene Abhängigkeit wurde von RAMACHANDRAN *et al.* in einem, für Peptide häufig dargestellten Plot zusammengefasst.^[7,8] Da Sekundär- und Tertiärstruktur in dieser Arbeit eine zentrale Rolle einnehmen, soll eine kurze Zusammenfassung dieser Merkmale erfolgen.

Die Kategorie der Sekundärstruktur enthält drei dominante Elemente, die durch Wasserstoff-Brückenbindungen, Seitenketteninteraktionen und Lösungsmiteleinfluss stabilisiert werden.^[5] Das laut der größten Proteinstrukturdatenbank^[9] am häufigsten auftretendes Sekundärstrukturelement ist die Helix, eine schraubenförmige Anordnung von Aminosäuren, deren Stabilisierung maßgeblich von Wasserstoff-Brückenbindungen bestimmt wird.^[10] Die Helix wird im Wesentlichen durch die Anzahl der Aminosäuren pro Drehung und ihrer Steigung pro Windung beschrieben und kann dadurch erneut in Unterkategorien wie α -Helix, 3.10-Helix und π -Helix unterteilt werden.^[10] Während das Motiv der α -Helix, das mit 31% Strukturanteil in Proteinkristallstrukturen am häufigsten vertreten ist, sehr gut charakterisiert ist und auch die 3.10-Helix mit 4% zahlreiche Beispiele findet, war das Vorhandensein der π -Helix bis vor zwei Dekaden Zentrum wissenschaftlicher Debatten.^[11,12] Die energetisch ungünstige Anordnung der ϕ - und ψ -Winkel, die sich am Rande des erlaubten Bereichs im RAMACHANDRAN-Plot^[7] bewegen, sowie der große Radius der π -Helix, der die VAN DER WAALS Interaktionen verhindert und das dadurch entstehende Loch, das durch Wassermoleküle nicht aufgefüllt werden kann, sind Faktoren, die die Stabilität der π -Helix verringern.^[13] In den darauffolgenden Jahren wurden jedoch zunehmend Sequenzen mit alternierenden D- und L-Aminosäuren veröffentlicht, die eindeutig diese Strukturmerkmale aufweisen.^[14-16] Bezüglich der Stabilität einer isolierten α -Helix ist

hervorzuheben, dass diese in einem Gleichgewicht mit der engeren 3.10-Helix steht.^[17] Die Möglichkeit Strukturwechsel einzugehen, trägt, gerade bei längeren Peptidsequenzen, entropisch zur Stabilisierung dieses Sekundärstrukturelements bei.^[18]

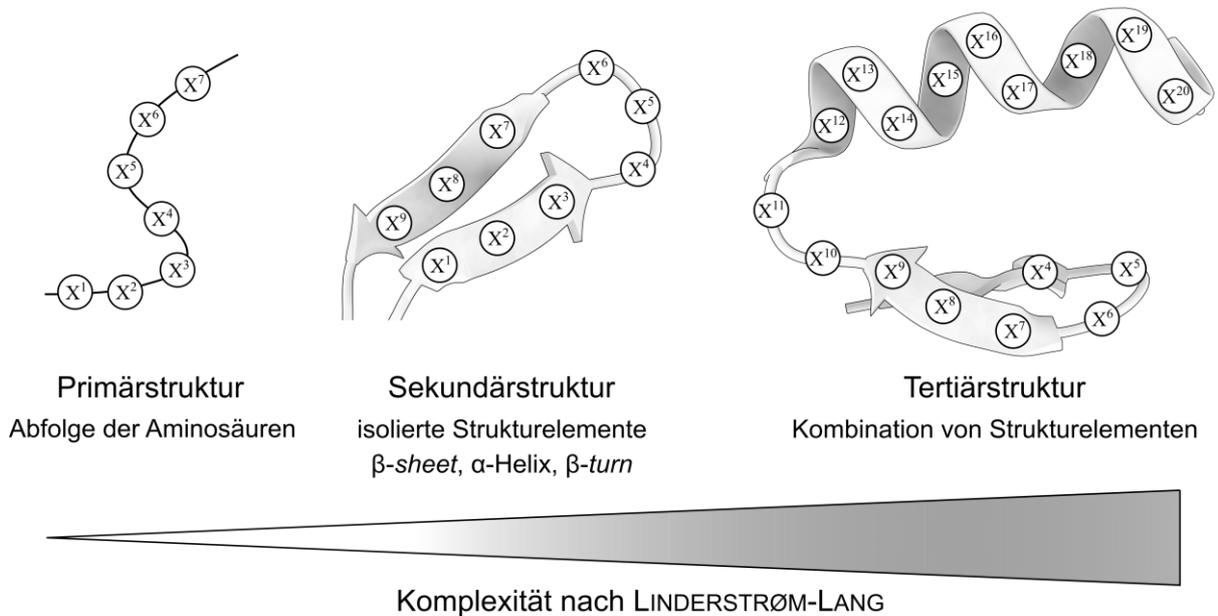


Abbildung 2: Kategorisierung von Proteinstrukturen nach Linderstrøm-Lang.^[5] Die Primärstruktur besteht aus einer definierten Abfolge von Aminosäuren, die in Lösung zu einer Sekundärstruktur angeordnet werden kann. Eine Kombination dieser Strukturelemente führt zur Ausbildung der Tertiärstruktur, die in größeren Polypeptiden zu finden ist.

Das Muster der Wasserstoffbrückenbindung des zweiten Sekundärstrukturmerkmals, des β -Faltblatts, im weiteren Verlauf dieser Arbeit als β -sheet bezeichnet, unterscheidet sich wesentlich vom helikalen Strukturtyp.^[5] Erneut erfolgt eine Unterteilung, in diesem Fall in parallele und antiparallele β -sheets, die auf die Art der Ausrichtung zweier Peptidstränge zueinander beruht.^[6,19] Laut theoretischen Überlegungen, erneut postuliert von PAULING *et al.*,^[6] beträgt $\varphi = -180^\circ$ und $\psi = 180^\circ$, was zu einer „Zick-Zack“-Anordnung des Peptidrückgrats führt, wobei diese Werte nur bei einem β -sheet möglich wären, das komplett aus Glycin Aminosäuren besteht.^[10] Daher ist häufig eine Verzerrung bei experimentellen Strukturen zu beobachten, die auf den nichtbindenden Interaktionen innerhalb eines Strangs und geometrische Einschränkungen zwischen zwei Strängen beruht.^[10] Analysen von Proteinsequenzen mit antiparallelem β -sheet haben gezeigt, dass die Häufigkeit mit zunehmender Länge des Peptidstranges abnimmt.^[20] Es konnte zudem keine zusätzliche Stabilisierung des Strukturmotivs über einer Stranglänge von sieben Aminosäureresten hinaus gefunden werden, was zu einer Limitierung bei dem Design von Peptiden mit hohem β -sheet-Anteil resultiert. Im Kontrast dazu tritt diese Einschränkung nicht bei α -Helices und parallelen β -sheets auf.^[20,21] Eine Gemeinsamkeit zwischen Helix und sheet ist ihrem linearen Charakter zu finden.^[5] Daher braucht es, um eine multidirektionale Verknüpfung zu ermöglichen, eine weitere Sekundärstruktur, den turn. Das Augenmerk gilt hierbei dem *reverse turn*, da dieser meist auf der exponierten Seite von Proteinen auftritt und dadurch in der molekularen Erkennung eine bedeutende Rolle einnimmt.^[22,23] Dadurch erlangt der *reverse turn* eine

große Bedeutung als beliebtes Templat für das Design neuer Medikamente, basierend auf definierten Peptidstrukturen. Die Klassifizierung der *turns* erfolgt zum einen durch die Anzahl der Aminosäuren, die am Strukturelement beteiligt sind, zum anderen in ihrer Winkelausrichtung innerhalb des *turns*.^[24,25] Zu unterscheiden sind γ -, β - und α -*turns*, die jeweils aus drei, vier oder fünf Aminosäuren aufgebaut sind und erneut in Subkategorien, Typ I, I', II, II' *et cetera* aufgeteilt werden. Neuere Studien postulierten sogar die Existenz von β -*turns* mit Typ VIII.^[26,27] Analysen von Proteinstrukturdatenbanken enthüllten, dass der β -*turn* die größte Häufigkeit besitzt und durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Positionen i und $i+3$, ausgehend vom N- zum C-Terminus, stabilisiert wird.^[23,28] Die Subkategorien des β -*turns* werden durch die Stereochemie der Aminosäuren der Positionen $i+1$ und $i+2$ bestimmt. Die Kombination von L-L Aminosäuren im β -*turn* ist in Proteinen am häufigsten zu finden und wird deshalb als Typ β I bezeichnet.^[29] Werden die Aminosäuren durch ihre entsprechenden Spiegelbilder (D-D), ersetzt so wird der enantiomere β I'-*turn* erhalten. In Analogie dazu, können L-D einen β II-*turn* induzieren und D-L den entsprechenden β II'-*turn*.^[29] Das Motiv des klassischen β -*hairpins* besteht aus aufeinanderfolgende, antiparallel verknüpfte β -Stränge, die häufig durch Typ β I', β II' verknüpft sind (Abbildung 3). Der Grund dafür liegt bei der rechtsgängigen Verdrillung der Stränge des *hairpins*, die inkompatibel mit der linksgängigen Verdrillung eines β I-*turns* wären.^[30,31]

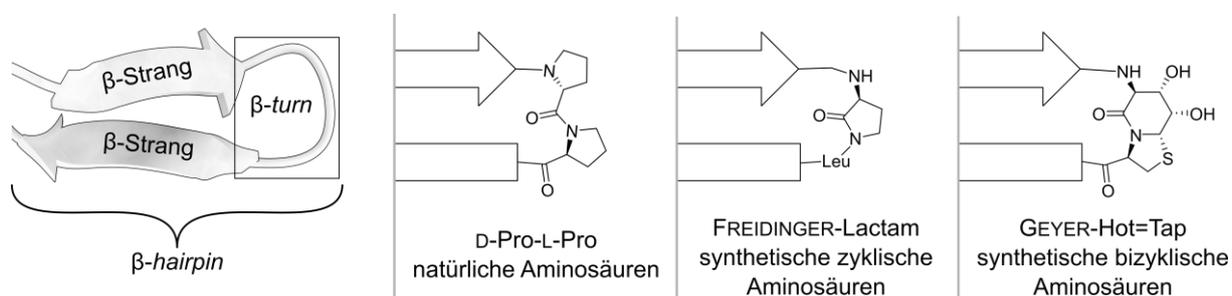


Abbildung 3: Einsatz von natürlichen (D-Pro-L-Pro) und unnatürlichen (FREIDINGER-Lactam^[32] oder GEYER-Hot=Tap^[33]) β -*turn* Mimetika in β -*hairpin* Peptiden.

Die geringe natürliche Häufigkeit von D-Aminosäuren in Biomolekülen reflektiert sich auch in dem unterdurchschnittlichen Vorkommen der drei zuletzt genannten *turn*-Kategorien.^[29] Aufgewogen wird dieses Ungleichgewicht durch Glycin, das nur eine geringe Torsionswinkelpräferenz besitzt und häufig als Ersatz für D-Aminosäuren in β -*turns* zu finden ist.^[34] Im Gegensatz zu Glycin, das eine sehr flexibles Rückgrat aufweist, gibt es Aminosäuren, die einen bestimmten Typ von *turn* induzieren können. Aufgrund der chemischen Zusammensetzung von Prolin, dessen Pyrrolidinring auf $\varphi = -60^\circ$ beziehungsweise 60° , abhängig von der Stereokonfiguration eingeschränkt ist, zeigt es die höchste Tendenz einen *turn* einzuleiten.^[34] Da die Form und Stabilität des *turns* zugleich eine enorme stabilisierende Wirkung auf den gesamten *hairpin* ausübt, wurde früh begonnen, Modifikationen einzuführen um gezielt die Stabilität des *hairpins* zu beeinflussen.^[35] Da die Kombination von natürlichen Aminosäuren aufgrund der limitierten Bibliothek schnell an ihre Grenzen gelang, wurden synthetische Bausteine entwickelt, die einen β -*turn* imitieren sollten, so genannte β -*turn* Mimetika. Erste Untersuchungen von FREIDINGER *et al.*^[32] zur Stabilisierung vom β II'-*turn* des Peptidhormons

Gonadoliberin, durch den Einbau eines unnatürlichen γ -Lactam-Dipeptids, motivierten die wissenschaftliche Community und schon wenige Jahre später etablierten auch andere Arbeitsgruppen ihre β -turn Mimetika.^[23,36,37] NAGAI und SATO nutzten dabei das vorherrschende Dogma, durch die Erstellung eines bizyklischen Systems das Rückgrat auf die gewünschte Weise zu fixieren und publizierten ihr, auch in aktuellen Publikationen noch verwendetes, „ β -turn-dipeptide“ BTD.^[38,39] Die Synthese erfolgt aus der Kondensation von Glutaminsäure und Cystein und wurde zahlreich in der Literatur untersucht.^[40,41] Durch die einfache synthetische Zugänglichkeit entwickelten ECKHARDT *et al.* ein Derivat, das aufbauend vom BTD eine zusätzliche β -Verzweigung aufweist und eine erhöhte Rigidität im *turn* induziert (Abbildung 3).^[33] Das β II'-Turnmimetikum mit dem Namen Hot=Tap wurde in NMR-Studien durch den Einbau in zyklischen Hexa-Peptiden mit BTD verglichen und analysiert.^[33] Zudem konnte seine Kompatibilität mit *turn*-Strukturen in einer Proteinumgebung am Beispiel des *Foldon-Trimers* beschrieben werden, in dem es durch die Hydroxygruppen am Sechsring weitere nicht native Wechselwirkungen vermittelte und eine Kristallisierung des Strukturmotivs ermöglichte.^[33]

Zwar steuern Wasserstoffbrückenbindungen einen bedeutenden Teil zur Stabilisierung von Sekundärstrukturen bei, allerdings benötigt es zusätzliche Interaktionen der Seitenketten, wie zum Beispiel hydrophobe-, π - π -, π -Kationen- und ionische Wechselwirkungen,^[42] um das Ausbilden von Tertiärstrukturen zu faszinieren (Abbildung 4). Eine Disulfidbrücke, als zweiter Typ der kovalenten Bindungen in einer Polypeptidkette, erlaubt mit ihrer hohen Sequenzspezifität die Stabilisierung von anderweitig labilen Strukturelementen.^[43] Für die Bildung einer Disulfidbrücke werden freie Thiole in Form von Cysteinseitenketten benötigt, die sich entweder mit einem Cystein der gleichen Sequenz zu einer intramolekularen, oder mit einem Cystein von einem weiteren Biomolekül zu einer intermolekularen Disulfidbrücke verbinden können. Cysteine bzw. Disulfidbrücken kommen in zahlreichen Biomolekülen mit unterschiedlichster Funktion vor, z.B. Toxine^[44] Cyclotide^[45] oder Zinkfingerproteine.^[46] Zwar ist die Stabilisierung durch Disulfidbrücken enorm, jedoch kann die Summe aus mehreren nicht-kovalenten Wechselwirkungen, wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, einen ähnlichen Effekt erzielen.^[10] Diese Wechselwirkungen können auch zwischen Seitenketten auftreten, da bei physiologischem pH-Wert mindestens ein Teil der Seitenketten ionisiert sind.^[10] Diese Salzbrücken können zwischen Carboxylaten (ausgehend von Asparaginsäure und Glutaminsäure) und Stickstoffprotonierten Resten (Arginin, Lysin und Histidin) entstehen und besitzen mit je 8-20 kJ/mol ein enormes Stabilisierungspotenzial.^[47] Die Besonderheit dieser Wechselwirkungen liegt in ihrer extremen Abhängigkeit von exogenen Faktoren, wie dem pH-Wert, Salzgehalt und der Lösungsmittelzusammensetzung, die ein gezieltes Proteindesign, auf Grundlage solcher Interaktionen, erschweren.^[10]

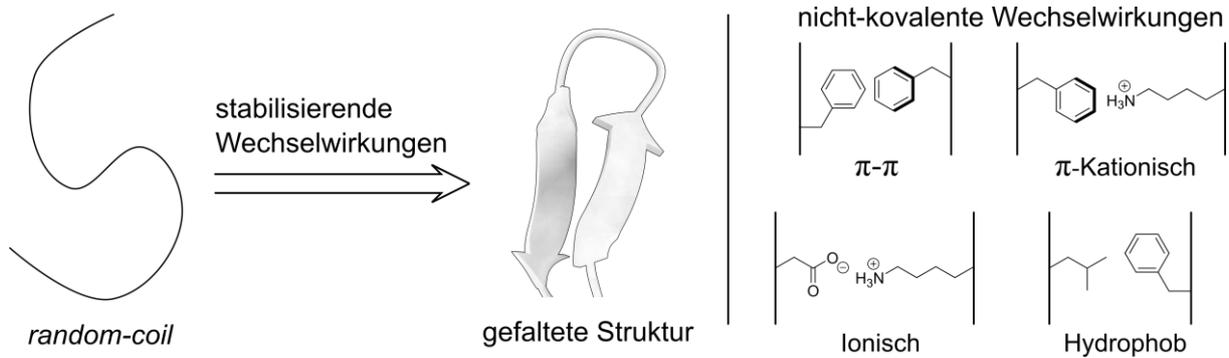


Abbildung 4: Darstellung nicht-kovalenter Wechselwirkungen, die zur Faltung eines Peptides vom *random-coil* zur Sekundärstruktur benötigt werden. Die Zusammensetzung dieser Wechselwirkungen ist maßgeblich für die Form und Stabilität des entsprechenden Strukturelements verantwortlich.

Neben Aminosäuren mit polaren Seitenketten, finden sich in einer ähnlichen Abundanz auch hydrophobe unpolare Reste in Biomolekülen.^[10] Auch Sie tragen zur Ausbildung von Sekundär- bzw. Tertiärstruktur bei, wobei ihre stabilisierende Wirkung nicht nur auf einfache VAN DER WAALS-LONDON-Interaktionen beruht.^[48] Der „hydrophobe Effekt“ wird hauptsächlich durch entropische Einflüsse hervorgerufen. Hydrophobe Seitenketten (zum Beispiel in Leucin, Valin, Phenylalanin) sind in wässriger Umgebung durch einen molekularen Film von höher geordneten Wassermolekülen bedeckt, was eine entropische Erniedrigung des System zur Folge hat, da polare Gruppen oder Moleküle eine Aggregation anstreben, um so die Kontaktfläche mit lipophilen Stoffen bzw. Lösungsmittel zu verringern.^[10,48] Zwar führt die Annäherung von hydrophoben Gruppen ebenfalls zu einer Entropiesenkung, jedoch steigt gleichzeitig durch die Verdrängung des Wasserfilms die Entropie des Lösungsmittel drastisch an. Dieser Anstieg nimmt solche Ausmaße an, dass die enthalpischen Effekte überlagert werden können.^[48,49] Erst das Zusammenspiel von Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken, hydrophoben Effekten und weiteren etwaigen Wechselwirkungen ermöglicht die Ausbildung von stabilen dreidimensionalen Tertiärstrukturen. Dies soll jedoch heißen, dass Proteine keine dynamischen Bewegungen durchführen. Im Gegenteil, während die Dynamik von isolierten Peptidsequenzen durch schnelle, lokale Fluktuationen der Seitenketten geprägt sind,^[50] können Proteine langsame Bewegungsmoden erschließen, die häufig einen wichtigen Bestandteil ihrer biologischen Funktion einnehmen.^[51] Um diese Biomoleküle auf ihre Stabilität und Eigenschaften untersuchen zu können, ist es notwendig eine Vielzahl an spektroskopischen Methoden anzuwenden, da die Bewegungen in unterschiedlichen Zeitskalen ablaufen.^[52] Proteine bieten jedoch in dieser Hinsicht einige Herausforderungen. NMR-spektroskopisch sind sie nur schwer zugänglich, da ab einer gewissen molekularen Größe (bzw. Gewicht) eine erhebliche Überlappung von Signalen die genaue Zuordnung erschwert oder gar verhindert.^[10] Zusätzlich sinkt mit der Größe des Polypeptids seine Beweglichkeit gemäß des STOKES' Gesetz.^[53] Hierbei besitzt ein Molekül eine gewisse Korrelationszeit, die vom effektiven hydrodynamischen Radius abhängig ist.^[53] Selbst bei relativ kleinen Proteinen, wie dem Ubiquitin, beträgt die Korrelationszeit bereits wenige Nanosekunden,^[54] was sogar bei einem Spektrometer mit großer Feldstärke bereits länger als die inverse Larmorfrequenz ist. Dadurch nimmt

die Effizienz des Mittelungsprozesses durch die Rotation ab, was zu einer erheblichen Verbreiterung der Resonanzlinien und damit schwierigeren Zuordnung des Proteins führt.^[10] Diese Linien können teils so breit werden, dass Signale, die im Spektrum vorhanden sein müssten, nicht auftauchen. Spezielle Techniken wurden entwickelt, um es zu ermöglichen von bestimmten Proteinen dennoch NMR-spektroskopische Untersuchungen durchführen zu können.^[55-57] Weiterhin ist die Synthese von größeren Proteinen aufwändig und benötigt viel Zeit, da im Vergleich zu kleineren Peptiden keine Festphasensynthese nach MERRIFIELD möglich ist.^[58] Da meist nur ein gewisser Teil des Proteins für die Reaktionen mit anderen Molekülen notwendig ist, versuchten viele Arbeitsgruppen die gezielte Isolation der einzelnen Peptidsequenzen, um diese zu studieren.^[59-64] Eine Herausforderung besteht jedoch darin, dass eine Großzahl der isolierten Peptide nicht in der im Protein eingenommenen Sekundärstruktur oder Tertiärstruktur faltet.^[59] Einige spezielle Sequenzen, auch Miniproteine genannt, sind trotz ihrer kleinen Größe in der Lage, trotz ihrer kleinen Größe, Protein-ähnliche Strukturen und Eigenschaften aufzuweisen. Im folgenden Kapitel soll diese Strukturklasse inklusive einiger Vertreter kurz beleuchtet werden.

1.2 Miniproteine - ein historisches Abbild

Miniproteine sind kurze Proteine mit einer Länge von bis zu 40 Aminosäuren, wohl definierten Faltungen, bestehend aus zwei oder mehr Sekundärstrukturelementen und gesonderten hydrophoben Kern.^[59] Miniproteine ermöglichen es, die Komplexität von großen Proteinen zu verringern, um dadurch neuartige Sequenz-zu-Struktur-Beziehungen und strukturelle Eigenschaften zu untersuchen. Durch den kleineren und schwächeren hydrophoben Kern benötigen Miniproteine häufig zusätzliche Stabilisierung, wie Metallbindungen, kovalente Kreuzverknüpfung oder Oligomerisierungen durch intermolekulare Wechselwirkungen, z.B. *EF-hands*,^[65] Zinkfinger,^[66] Foldon^[67] und Cystein-Knoten-Peptide (Abbildung 5).^[68] Während in den frühen 90er Jahren Miniproteine, die häufig aus mehr als 60 Aminosäuren^[69] aufgebaut waren, als Dimer vorlagen^[70] oder zusätzliche stabilisierende Faktoren wie Disulfidbrücken^[71] hatten, zeigte die zunehmende Expertise auf diesem Gebiet, dass auch der Aufbau von kompakteren Strukturmotiven möglich ist.^[59]

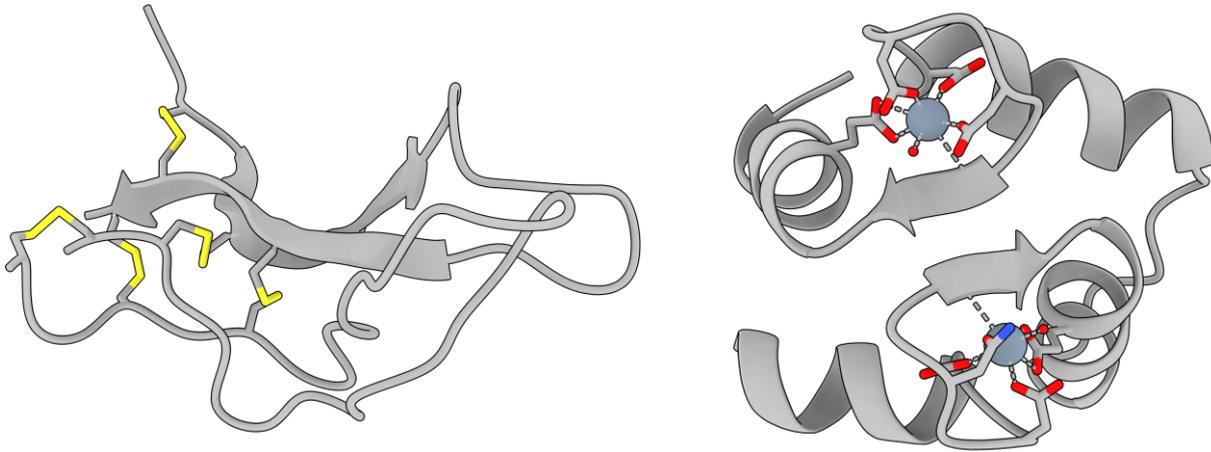


Abbildung 5: Schematische Darstellung zweier Proteinstrukturen mit Fokus auf die wichtigen stabilisierenden Faktoren. Links: Ausschnitt eines Cysteine-Knoten-Peptids (PDB: 1HCN)^[72] mit explizit dargestellten Disulfidbrücken. Rechts: Teilsequenz des *EF-hands*-Proteins (PDB: 1OSA),^[73] das im basischen Milieu über die Seitenketten von Asparagin und Asparaginsäure in der Lage ist, Calcium zu binden, wodurch eine enorme Stabilisierung der Tertiärstruktur erreicht wird. Das Entfernen dieser stabilisierenden Faktoren würde zu einem Zerfall der Tertiärstruktur zum *random-coil*-Peptid führen.

Einer der ersten Ansätze für das Studieren von Miniproteinen ist das stückweise Herausschneiden von bestimmten Sequenzen aus gut faltenden Proteinen. Ein prominentes Beispiel ist hier das C-terminale "Kopfstück" des *Villin* Proteins, welches 1996 von MCKNIGHT *et al.*^[74] entdeckt wurde. Es ist ein 35 Aminosäure langes Fragment, das drei helikale Segmente trägt, wobei jede Helix aliphatische Reste zum zentralen hydrophoben Kern beisteuert. Diese Sequenz stellt gleichzeitig das kleinste natürlich vorkommende Polypeptid dar, das autonom ohne die Präsenz von Kofaktoren oder Disulfidbrücken eine stabile Faltung einnimmt.^[74] Durch diesen dichten hydrophoben Kern, der aus drei Phenylalaninen und mehreren Leucinen zusammengesetzt ist, besitzt es zudem eine außergewöhnliche Temperaturstabilität von 70°C.^[75] Trotz dieser Eigenschaften überwiegen die theoretischen Applikationen dieses Strukturmotivs.^[76-78] Untersuchungen, die gezielt Modifikationen durch synthetische Aminosäuren vornehmen, lassen sich dahingehen selten finden, was auf eine limitierte Handhabung schließen lässt.

Während viele Peptidsequenzen einen α -helikalen Anteil aufweisen, ist das natürliche Vorkommen von stabilen *stand-alone* β -*hairpin*-Miniproteinen stark begrenzt.^[59] Frühere Beispiele, die auf natürlichen Fragmenten basieren, zeigten zunächst eine geringe Faltung im wässrigen Milieu.^[79,80] Durch gezieltes Design entwickelten COCHRAN *et al.* jedoch den Tryptophan-Reißverschluss, ein 12-16 Aminosäure langer *de novo* β -*hairpin*, mit ineinander verzahnten Tryptophanen, die einen rechtsgängigen, hoch verzweigten Strang enthalten.^[81] Aufgrund ihrer Kation- π Wechselwirkungen, bei der ein Lysin in die Kluft zwischen zwei Tryptophanen ragt, demonstrieren diese Miniproteine eine ausgezeichnete thermische Stabilität.^[82,83] Der Tryptophan-Reißverschluss ist ein sehr gut untersuchtes Miniprotein, wodurch sich mittlerweile gut definierte Regeln für das Design von stabilen *hairpins* ergeben haben. Hierzu zählt ein dicht gepackter hydrophober Cluster auf der einen Seite des *hairpins* in der Nähe des *loops*,^[84] Trp-Trp Wechselwirkungen,^[81,85] und geladene Aminosäuren um die Termini durch Kreuzstrang-Interaktionen zu stabilisieren (Abbildung 6).^[86] Leichte Abänderungen in der Sequenz

führen jedoch zu einigen Nachteilen bezüglich der Handhabung des Handhabung des Miniroteins. Daher reduzierten COCHRAN *et al.* die Anzahl an Tryptophanen und kompensierten den daraus resultierenden Stabilitätsverlust durch ein Disulfid.^[87] SCHRIMPF *et al.* nutzten dieses Gerüst um stabile Peptidepitope zu entwickeln, die potenzielle Anwendungen in der Diagnostik von rheumatoide Arthritis aufzeigen.^[88]

Ein weiterer prominenter Vertreter der Miniroteine ist der Tryptophankäfig. Die Sequenz besteht aus ca. 20 Aminosäuren, die der C-terminalen Domäne des 39mer-Peptids *Exendin-4* entsprechen und erstmals aus dem Speichel der *Gila Krustenechse* isoliert wurden.^[89,90] Die ursprüngliche Sequenz zeigt nur in wässrigem Trifluorethanol, ein α -helikal stabilisierender Zusatz, eine messbare Faltung.^[89] Durch die gezielte Anpassung einzelner Aminosäuren gelang es ANDERSEN *et al.* eine stabile Faltung im wässrigen Milieu ohne Zusatz von TFE zu erreichen.^[91] Die dreidimensionale Anordnung enthält einen gut-strukturierten *loop* mit einem hydrophoben Kern, bestehend aus einem einzigen Tryptophan, der von den Seitenketten von vier Prolinen eingeschlossen wird und dem Tryptophankäfig seinen Namen verleiht. Anwendung findet dieser Käfig zahlreiche.^[92-94] Unter anderem dient er als Paradigma für experimentelle und computergestützte Faltungssimulationen, da durch seine geringe Größe längere Faltungszeiten simuliert werden können. Zusätzlich erlaubt der intensiv untersuchte Faltungsmechanismus auch den Einfluss von unnatürlichen Aminosäuren auf die Struktur zu klassifizieren.^[95] Besonders hervorzuheben sind dabei die Studien von ANDERSEN *et al.*, die mit Hilfe von unzähligen analytischen Methoden, insbesondere NMR- und CD-Spektroskopie, die Dynamik und Stabilität des Tryptophankäfigs untersuchten.^[96-98] Ein Nachteil dieses Systems ist die geringe Bandbreite an Substitutionen innerhalb des hydrophoben Kerns. Bereits die Mutation mit Phenylalanin führt zur massiven Destabilisierung der Tertiärstruktur.^[91]

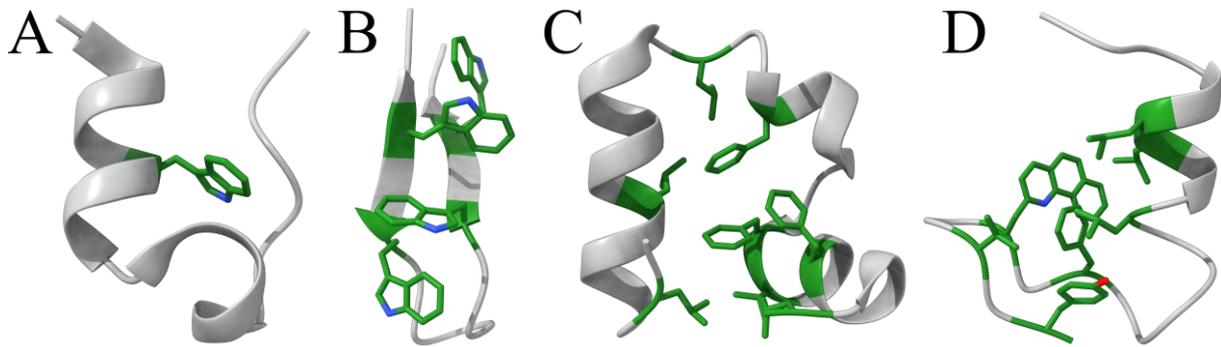


Abbildung 6: Auswahl an Miniroteinen und deren NMR-Strukturen, wobei der hydrophobe Cluster in allen Peptiden grün eingefärbt ist. Der Tryptophankäfig (A) (PDB: 1L2Y)^[89] wurde von ANDERSEN *et al.* entwickelt und besitzt nur ein einziges Tryptophan im hydrophoben Kern, während der von COCHRAN *et al.* designte Tryptophanreißverschluss (B) (PDB: 1LE3)^[81] vier ineinander verzahnte Tryptophane aufweist. Eines der kleinsten, natürlich vorkommenden Miniroteine ist das Kopfstück (C) des Villin-Proteins (PDB: 1YRI)^[99] das durch seinen großen hydrophoben Kern eine außergewöhnliche thermische Stabilität besitzt. Diese hydrophoben Wechselwirkungen können genutzt werden um Strukturen zu designen, die normalerweise nur in Gegenwart von Metall-Ionen falten würden. IMPERIALI *et al.* designte nach Vorbild des Zinkfingers ein Minirotein, welches in der apo-Form ähnliche Strukturelemente aufzeigt. (D) (PDB: 1HCW).^[100]

Ein weiterer Vertreter des durchdachten Miniproteindesigns ist das, dem Zinkfingermotiv nachempfundene, 23mer Peptid von IMPERIALI *et al.* (Abbildung 6).^[100] Normalerweise benötigen Miniproteine dieser Größe zusätzliche stabilisierende Faktoren, wie Disulfidbrücken oder Metallkoordinationsstellen, um eine stabile Faltung einzugehen. Diese Restriktionen verringern jedoch die Vielseitigkeit der Anwendungsmöglichkeiten beim Proteindesign.^[59] IMPERIALI *et al.* nutzten ein Strukturmotiv, das bereits 1989^[101] erstmals aufgeklärt wurde und in Kapitel 1.3 näher beschrieben werden soll - den Zinkfinger. Die $\beta\beta\alpha$ -Faltung, die durch die Zinkfingerdomäne dominant vertreten wird, offenbarte sich als ideales Ziel, da sie die gegebenen Anforderungen des modularen Aufbaus, sowie eine geringe Größe und konservierter hydrophober Kern, für das Miniproteindesign erfüllt. Zusätzlich existierten bereits zahlreiche Untersuchungen, basierend auf analytischen Methoden (NMR und CD-Spektroskopie) zu diesem Strukturmotiv.^[102-104] Ausgehend von diesem Motiv wurden fünf Peptidsequenzen ausgesucht und aus der Kombination der Sequenzen eine iterative Optimierung gestartet.^[100] Hierbei wurde zunächst die Metallbindungsseite mit Aminosäuren ersetzt, die eine Vorzugskonformation entsprechend des $\beta\beta\alpha$ Motivs aufweisen. Zwar konnte hierdurch eine ähnliche Vorfaltung erhalten werden, die jedoch immer noch eine Metallbindende Abhängigkeit auszeichnet. Durch Modifikation des β -turns von Typ II auf II', der eine stärkere strukturegebende Wirkung besitzt, und weiteren lokalen Änderungen, die das cis/trans-Verhältnis von Prolin-Aminosäuren beeinflussten, konnte im Endeffekt eine Struktur erhalten werden, die in Abwesenheit von Zink eine definierte $\beta\beta\alpha$ -Faltung aufweist.^[100] Die NMR-Strukturanalyse auf Basis von NOE-Kontakten zeigte jedoch, dass die Struktur einen größeren Abstand zwischen den Sekundärstrukturelementen besitzt.^[100] Dies ist nicht verwunderlich, da die zusammenhaltende Kraft, die durch eine Metallkoordination erreicht wird, nur schwer durch hydrophobe Wechselwirkungen ausgeglichen werden kann. Weiterhin konnte ein *cis*-Prolin-Anteil von bis zu 15% detektiert werden, der zu einer Destabilisierung der Struktur führt, was sich auch in der niedrigen thermodynamischen Stabilität dieses Strukturmotivs widerspiegelt.^[100] Die iterative Optimierung von Miniproteinen, basierend auf anderen, bereits etablierten Strukturtemplaten, wurde in den folgenden Jahrzehnten mehrfach angewendet.^[105-107] Ein modernes Beispiel für elegantes (Mini)Proteindesign ist die Trimerisierungsdomäne des T4 Fibrin - das Foldon. Wie bereits in Abbildung 3 erwähnt, besitzt die Kombination von D- und L-Prolin in direkter Abfolge einen *turn*-induzierenden Effekt. Die Stärke dieses Effekts konnte durch das von ECKHARDT *et al.*^[33] das *turn*-Mimetikum Hot=Tap erheblich gesteigert werden, welches neben seiner Fähigkeit, einen β II'-turn einzuleiten noch Seitenketten-artige Wechselwirkungen durch die Anwesenheit der Hydroxyl-Gruppen eingehen kann. Diese Eigenschaft machten sich die Autoren zu nutzen und platzierten diese synthetische Aminosäure an den Positionen 17 und 18 des Foldons um das Peptidrückgrat zu festigen. Die Einschränkungen resultierten nicht nur in einer stabilen Faltung, sondern führte im Vergleich zum *wild-type* auch zur erstmaligen Kristallisation des isolierten Trimers. Diese hochauflösende Kristallstruktur zeigte die Ausbildung zweier Foldon-typischer " β -sheet Propellers" Abbildung 7. Die Seitenketteninteraktionen von Hot=Tap förderten dabei die Ausbildung von Proteinoligomeren,

wodurch das Mimetikum innerhalb der Protein-Protein-Oberfläche gefangen wurde. Hierdurch konnte erstmals der konformative Einfluss eines Mimetikums im Proteinkontext untersucht werden.^[108] Dieses Beispiel hebt hervor, wie durch geringe Modifikationen Struktureigenschaften erhalten bleiben und dennoch neuartige Charakteristiken (Kristallisierbarkeit) auftreten können. Ein besonderer Aspekt des Proteindesigns ist dabei die Bandbreite in der Funktionalität der verwendeten Aminosäuren. Zwar kann durch den ausschließlichen Einsatz von proteinogenen Aminosäuren komplexe Struktur motive entwickelt werden, jedoch erlaubt die Verwendung von Disulfiden labile Strukturelemente zu festigen und somit bestehende Systeme neu aufzubauen und zu modifizieren. Diese Vielseitigkeit kann erneut gesteigert werden, falls synthetische Aminosäuren eingebaut werden, wie das Beispiel des Foldons von ECKHARDT *et al.* hervorhebt (Abbildung 7).

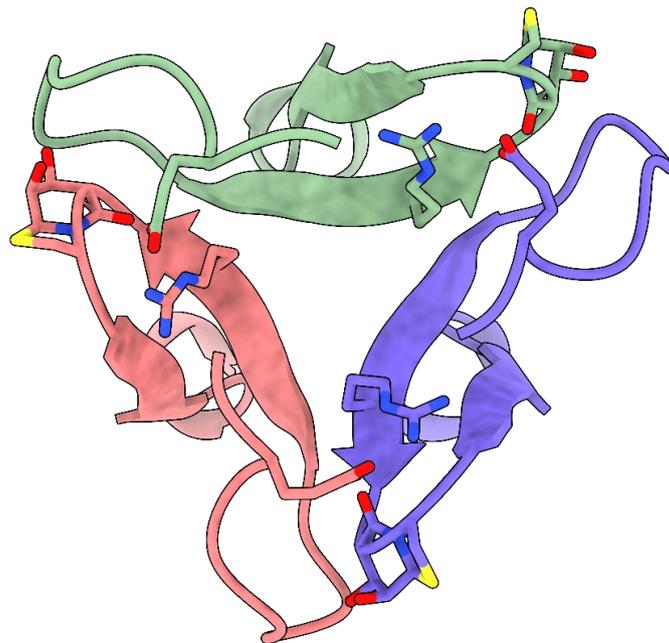


Abbildung 7: Auszug aus der Kristallstruktur des Foldons mit Hot=Tap als β -turn-induzierendes Mimetikum. Der Einbau des Dipeptids erlaubte neben der Stabilisierung des β -hairpin-Motivs die Ausbildung von Oligomeren, wobei Hot=Tap zwischen den Proteinoberflächen angeordnet ist.

1.3 Zinkfingerproteine

1.3.1 Entdeckung und historische Bedeutung

Zinkfingerproteine wurden erstmal 1985 als eigenständige Domäne in Transkriptionsfaktoren in den Eizellen des afrikanischen Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) identifiziert.^[109] Im gleichen Jahr konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor aus zwölf aufeinanderfolgenden Einheiten mit je 30 Aminosäuren besteht, wobei jede Einheit zwei Cysteine und Histidine als konservierte Aminosäuren besitzt, die um ein Zink(II)-Ion angeordnet sind.^[110] Dadurch wurde nicht nur ein neues Proteinstrukturmotiv, sondern auch ein neues Prinzip der DNA-Erkennung entdeckt. Bisherige DNA-Bindungsmotive, wie die Helix-turn-Helix, nutzten die Symmetrie der DNA-Helix aus, um spezifische

Wechselwirkungen einzugehen.^[111] Im Kontrast dazu können Zinkfingerproteine, die linear aus Tandemeinheiten aufgebaut sind, Nukleotidsequenzen unterschiedlicher Länge erkennen, unabhängig von der Symmetrie der DNA. Der Name Zinkfinger wurde zunächst von MILLER *et al.* postuliert und hatte pragmatische Gründe, da das untersuchte Protein Zink bindet und die DNA ergreift, wie die Finger einer Hand.^[109] Spätere Untersuchungen zur Anordnung der Aminosäuren im Strukturmotiv stellten ein Bild dar, das dem eines Fingers ähnelte und so wurde der Name in der Literatur angenommen.^[112] Die Einzigartigkeit von Zinkfingerdomänen zeigt sich darin, dass obwohl sie sehr kurz sind, bei der Koordination von Zink(II)-Ionen eine stabile Faltung eingenommen wird, die im Vergleich zu anderen kurzen Proteinsequenzen sehr dicht gepackt ist.^[113,114] Neben Cystein und Histidin im klassischen Zinkfinger, können auch einzeln Asparaginsäure oder Glutaminsäure für einen Liganden ausgetauscht werden, die jedoch keinen Einfluss auf die tetraedrische Koordinationssphäre ausübt.^[115,116] Die Bedeutung der restlichen Aminosäuren wurde zeitnah entschlüsselt. Die Regionen zwischen dem zweiten Cystein und dem ersten Histidin sind hierbei in spezifische Interaktionen mit DNA-Segmenten involviert.^[117-119] Die Stabilität des Zinkfingerkerns demonstriert eine große Abhängigkeit von Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen - nicht nur in unmittelbarer Nähe des Metallzentrums, sondern auch im Rest der tertiären Struktur.^[120-123] Weiterhin lässt sich eine Korrelation der tertiären Struktur mit dem Bindungsmotiv der Zink(II)-Ionen feststellen, das in CCHH, CCHC/CCCH und CCCC unterteilt werden kann.^[124] Alle besitzen unterschiedliche enthalpische und entropische Einflüsse, die zur Deprotonierung von Cystein und damit zur Metallkomplexierung führen.^[125-127] Neben dem Zink-bindenden Motiv enthüllte die Sequenzanalyse der Primärstruktur, dass bestimmte hydrophobe Aminosäuren (Tyrosin, Phenylalanin und Leucin) ebenfalls hoch-konserviert sind und den hydrophoben Kern des Proteins ausbilden.^[112] Dieser nimmt nicht nur eine bedeutende Rolle im Metall-gekuppelten Faltungsprozess ein, der in Kapitel 1.3.3 genauer erläutert wird, sondern stellt einen essenziellen Teil der Stabilität des Zinkfingerproteins dar.^[128,129] Wie bereits erwähnt, bestehen Zinkfingerproteine aus, voneinander unabhängigen Zinkfingerdomänen, und können daher individuell angepasst werden, um gezielt DNA oder RNA Sequenzen adressieren zu können. Sie dienen hierbei als ein exzellentes Werkzeug für Protein Engineering, um als Zinkfinger Nukleasen spezifische Gene zu regulieren.^[130-132] Die Bedeutung dieser Technik zeigt sich auch im Nobelpreis für Chemie 2020, der an den Nachfolger von Zinkfingern für Genregulation ging, CrisprCas9.^[133]

1.3.2 Das Strukturmotiv von Cys₂His₂-Zinkfingerpeptiden

Nachdem die Primärstruktur entschlüsselt wurde, erfolgten die ersten Untersuchungen zur Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie und zeigten typische Banden, die dem Strukturmotiv einer α -Helix entsprachen.^[102] Zusätzlich wurden Titrationsexperimente mit Zink durchgeführt und bestätigten, dass der Komplex in einem Verhältnis von 1:1 Zinkfingerdomäne zu Metall vorliegt.^[134] Da

Zink eine geringe Aktivität in der UV/VIS-Spektroskopie besitzt, wurde es durch das isoelektronische Kobalt(II) ersetzt, was zudem eine ähnliche Koordinationsgeometrie aufweist.^[102,135] Die hierdurch erhaltenden Peptidkomplexe zeigten zusätzliche Banden bei 650 nm, die durch die Koordination von Kobalt mit zwei Cysteinen und Histidine entstanden.^[135] Durch Vergleiche mit anderen, bereits beschriebenen Metalloproteinen, konnte die tetraedrische Geometrie der Koordinationssphäre bestätigt werden.^[102,135] Nachdem die Koordinationsumgebung und einzelne Sekundärstrukturelemente aufgeklärt waren, fehlte immer noch ein eindeutiges Bild zur Tertiärstruktur von Zinkfingerproteinen. Im Jahr 1988 entwickelten BERG einen Strukturvorschlag für das TFIIIA Zinkfingerprotein, basierend auf bisherigen experimentellen Daten und theoretischen Überlegungen.^[112] Er postulierte, dass das Hauptstrukturmotiv ein antiparalleles β -sheet in der Nähe des N-Terminus darstellt, gefolgt von einer C-terminalen α -Helix (Abbildung 8). Beide Sekundärstrukturen würden sowohl von der Zinkbindung als auch von der Ausbildung eines hydrophoben Kerns in der Nähe des *loops* zusammengehalten werden.^[112]

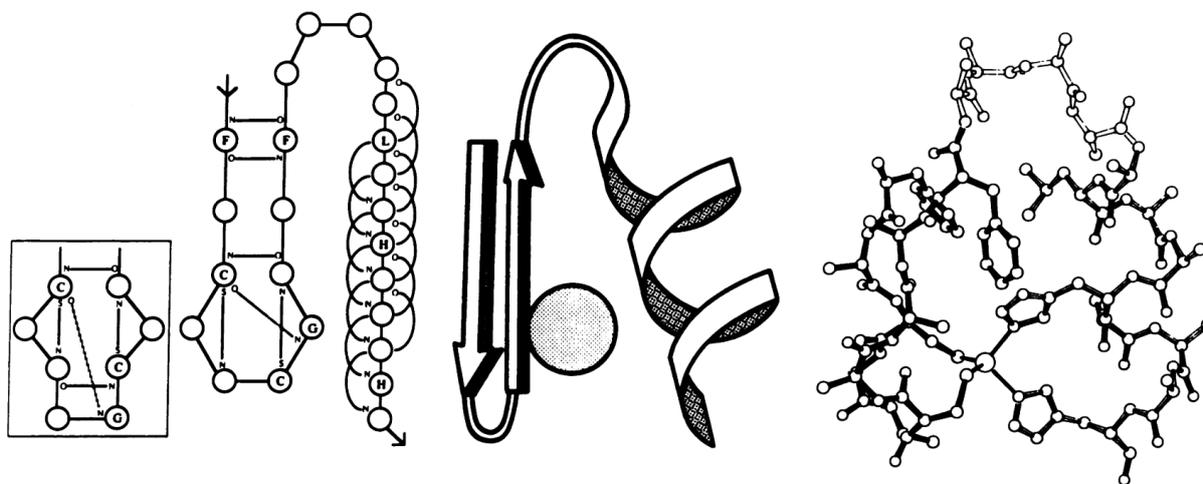


Abbildung 8: Korrekter Tertiärstrukturvorschlag von BERG im Jahr 1988,^[112] die auf der linken Seite das Wasserstoffbrückenbindungsmuster der Zinkfingerdomäne zeigt. Mittig: Cartoon-artige Darstellung der beiden Sekundärstrukturen, des antiparallelen β -sheets, gefolgt von der α -Helix, die ein Zink(II)-Ion einschließen. Das rechte Bild zeigt die Zinkfingerstruktur in Form von Stäbchen und Kugeln, wodurch die Koordination von Cystein und Histidin an Zink(II) zu erkennen ist.

Gleichzeitig entwickelte auch GIBSON *et al.* einen ähnlichen Strukturvorschlag, der sich nur in einer Verschiebung von zwei Aminosäuren im β -sheet unterscheidet, jedoch wenig später durch NMR-Strukturberechnungen des isolierten *Xfin31*-Zinkfingerpeptids widerlegt wurde und damit den Strukturvorschlag von BERG bestätigte.^[101,136] Die NMR-Strukturen offenbarten zudem, dass das β -sheet durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Tyrosin¹ und Phenylalanin¹⁰ stabilisiert wird, während die α -Helix die, für sie charakteristischen, Wasserstoffbrückenbindungen im Rückgrat bildet ($i_{\text{NH}} - i+1_{\text{NH}}$, sowie $i_{\alpha} - i+3_{\text{NH}}$).^[5] Nahezu zeitgleich publizierten NEUHAUS *et al.* die NMR-Struktur eines Zinkfingers mit zwei Domänen, wodurch gezeigt werden konnte, dass die benachbarten Zinkfingerstrukturell unabhängig und durch einen flexiblen Linker verbunden sind.^[137,138] Auch die NMR-basierte Analyse von weiteren Zinkfingerproteinen bekräftigte dieses Bild und betonte zudem, dass die Anzahl

an Aminosäuren zwischen den Metallbindenden Resten einen großen Effekt ausübt.^[139-141] Der Abstand zwischen den beiden Histidinen beträgt drei Aminosäuren, wodurch das zweite Zink-bindende Histidin auf die gleiche Seite steht und dadurch die tetraedrische Koordination ermöglicht. Die Größe des *turns* zwischen den Cysteinen ist variabel mit zwei bis vier Aminosäuren.^[138]

Die Klassifizierung von Zinkfingerproteinen erfolgt aufgrund ihrer Domänenzusammensetzung, die in Korrelation mit ihrer Koordinationsgeometrie und Funktion steht.^[113] Aktuell gibt es mehr als zehn bekannte Klassen von Zinkfingern, wobei die am meisten vorkommenden Kategorien wie folgt definiert sind: $\beta\beta\alpha$, *gag knuckle*, *treble clef*, *zinc ribbon*, Zn_2Cys_6 , *Taz2* und *zincloops*.^[113,142-144] Im Rahmen dieser Arbeit soll jedoch nur das $\beta\beta\alpha$ -Motiv im Fokus stehen, die zudem die größte Gruppe in allen Zinkfinger enthaltenden Proteinen in Eukaryoten darstellt.^[113] Mehr als 3% aller Gene im menschlichen Genom kodieren $\beta\beta\alpha$ -Zinkfingerproteine.^[46] Auch diese Kategorie kann erneut in zwei Hauptgruppen unterteilt werden, den Zinkfingern, mit nur einer DNA-bindenden Domäne (z.B. *KLF*^[145] und *SPI*^[146]) und mit zusätzlichen konservierten Domänen, die irrelevant zur Zinkfingerfaltung sind, wie *Krab*, *SCAN* und *BTB* Domäne.^[147-149] Das Koordinationsmotiv mit der größten Abundanz in der $\beta\beta\alpha$ -Zinkfingerfamilie ist CCHH, mit einem allgemeinen Primärsequenzmuster Y/F-X-C-X_{2,4}-C-X₃-X-L-X₂-H-X_{3,4}-H.^[113] BERG *et al.* analysierten 1991 die Primärsequenz von 131 Zinkfingerproteinen mit CCHH-Motiv, überlagerte alle Sequenzen und generierte anhand der Häufigkeit die *consensus zincfingerprotein sequenz CP-1* (Abbildung 9).^[150] Dieser synthetische Zinkfinger zeigt im Vergleich zu natürlichen Derivaten die höchste Affinität für Zink(II) und Kobalt(II)-Ionen und wurde in der Literatur in den folgenden Jahren mehrfache verwendet, um Metallkoordination und Thermodynamik von CCHH Zinkfingern zu untersuchen.^[151-153] Neben den zinkbindenden Aminosäuren, ist der hydrophobe Kern, beziehungsweise seine Beschaffenheit, kritisch für Interaktionen zwischen Proteinoberflächen und Lösungsmittel, die die enthalpische und entropische Stabilität des Zinkfingerproteins beeinflussen.^[128,129,154,155] Wird die Aminosäuren Phenylalanin, durch Leucin im ZFY-Zinkfingerpeptid ausgetauscht, so faltet der Zinkfinger zwar im $\beta\beta\alpha$ -Strukturmotiv, jedoch ist zeitgleich ein Verlust an thermodynamischer Stabilität zu beobachten.^[156,157] Neben dem zentralen Phenylalanin besteht der hydrophobe Kern zusätzlich aus einem, von der α -Helix stammenden, Leucin. Um die Bedeutung dieser Aminosäure hervorzuheben, wurde eine der aliphatischen Gruppe durch einen weniger voluminösen Rest substituiert, was eine Herabsetzung der DNA-Bindungsaffinität zur Folge hat.^[158]

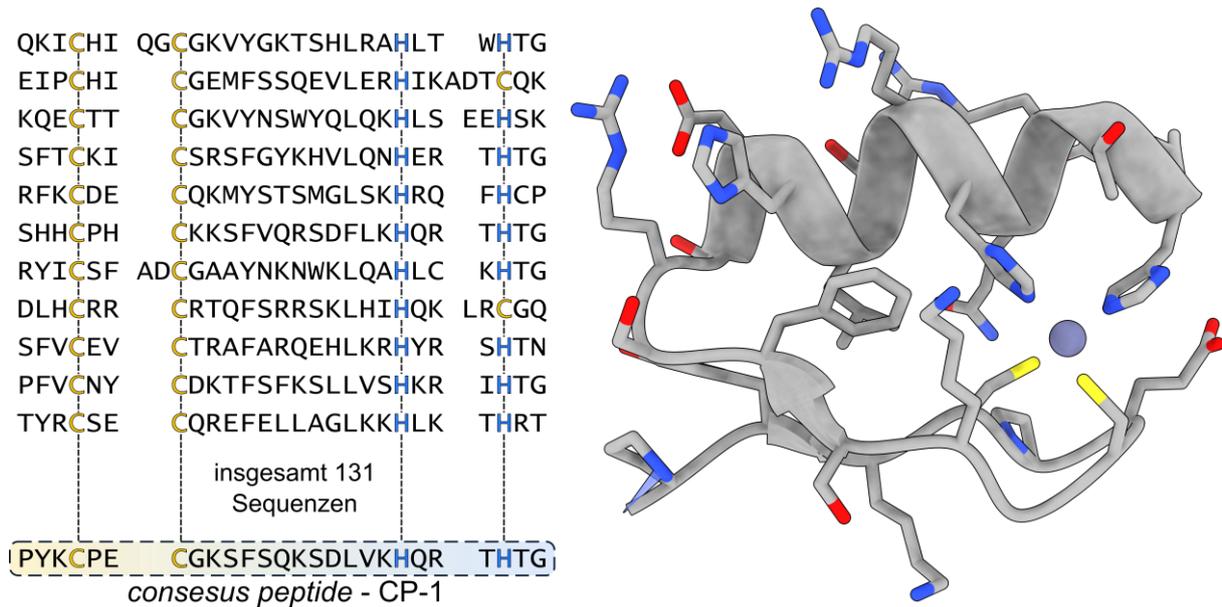


Abbildung 9: Links: Ausschnitt einiger Sequenzen, die für die Erstellung der *consensus peptide* Sequenz CP-1 von BERG *et al.*^[150] ausgewählt wurden. Anhand der Häufigkeit der jeweiligen Aminosäuren wurde ein Strukturmotiv entwickelt, das eine höhere Zink-Affinität besitzt als sämtlich damalig bekannten natürlichen Zinkfingerpeptide. In Orange beziehungsweise blau sind die konservierten Zink-bindenden Aminosäuren gekennzeichnet. Rechts: Schematische Darstellung eines Ausschnitts der Kristallstruktur des von BERG *et al.* designten Zinkfingerproteins gebunden an DNA. Es wurde der Zinkfinger dargestellt, der die größte Ähnlichkeit mit CP-1 besitzt. (PDB: 1MEY)^[159] Gut zu erkennen ist die tertiäre Struktur des Zinkfingerpeptids, bestehend aus einem antiparallelen β -sheet und einer α -Helix.

1.3.3 Metallabhängige Faltung von Zinkfingerproteinen

Sequenzanalysen und bioinformatische Studien vom menschlichen Genom haben gezeigt, dass ungefähr 10% aller Proteine in Zinkbindungen involviert sind.^[160,161] Dies ist nicht verwunderlich, da Zink(II)-Ionen eine einzigartige Rolle, nicht nur in der katalytischen Aktivität von Enzymen,^[162] sondern auch in der Stabilisierung von Proteinen und Einleiten von Faltungsmechanismen, einnehmen.^[102,163-166] Wie bereits erwähnt, enthalten Zinkfingerproteine metallbindende Aminosäuren, hauptsächlich Cystein und Histidin. Durch EXAFS-Spektroskopie gelang es, die Bindungslänge zwischen Zn-S und Zn-N mit 2.3 bzw. 2.0 Å zu bestimmen, was zudem eine gute Übereinstimmung zu anderen Metalloproteinen aufweist.^[167-169] Wesentlich häufiger, wurden jedoch UV/VIS spektroskopische Untersuchungen von Zinkfingerpeptiden mit Metallionen offener d-Schalen, wie Kobalt(II) oder Nickel(II) durchgeführt.^[170-174] Die Komplexierung solcher Ionen resultiert in charakteristischen *charge-transfer* oder d-d-Banden im sichtbaren Bereich, mit hohen molaren Absorptionskoeffizienten. Dies erlaubt es, die Komplexierung von Metallen in mikromolaren Konzentrationen zu beobachten und Dissoziationskonstanten zu bestimmen.^[175,176] Da Zink UV/VIS-spektroskopisch stumm ist, kann die Affinitätsberechnung nur indirekt erfolgen. Zunächst wird *isostrukturelles* Kobalt(II) genutzt, das zwar mit einer geringeren Affinität an das Zinkfingerprotein bindet, jedoch die gleiche tetraedrische Koordinationssphäre ausbildet.^[113] Anschließend kann durch die Zugabe von Zink(II), Kobalt(II) verdrängt und eine umgedrehte Titration durchgeführt werden.^[135,177] Eine weitere, vielgenutzte,

Methode um Affinitäts-Struktur-Beziehungen herzustellen, ist die Zugabe von Chelatoren. Manche Zinkfingerproteine besitzen jedoch Metallkoordinationen mit außergewöhnlicher Stabilität, sodass selbst EDTA, ein in der Literatur standardmäßig verwendeter starker Chelator, nicht in der Lage ist, Zink vollständig zu binden. ^[152,178,179] Damit eine vollständige Bindung von Zink an die Thiole der Cysteine ermöglicht werden kann, ist eine Deprotonierung zum entsprechenden Thiolat erforderlich. Der pKs-Wert von Cysteinen in *random-coil* Peptiden liegt in einem Bereich von 8 - 8.5.^[180] Die Acidität von Thiolen wird maßgeblich von ihrer Umgebung beeinflusst, so auch in Zinkfingern. Die räumliche Anordnung der Cysteine ist von elementarer Bedeutung, da positiv geladene, benachbarte Gruppen den pKs-Wert reduzieren und eine Deprotonierung erleichtern. Dieser Effekt kann durch negativ geladenen Aminosäuren in Nachbarschaft umgekehrt werden.^{[181] [182] [183]} Sehr auffällig ist der Einfluss bei Zinkfingerproteinen, die vier Cysteine als metallbindende Aminosäuren besitzen, wie LATOUR *et al.* im Jahr 2010 mit Hilfe von Titrationsexperimenten und NMR-Spektroskopie demonstrierte (Abbildung 10).^[152] Jedes Thiol besitzt einen deutlich unterschiedlichen pKs-Wert, der mit der Position in der Aminosäuresequenz zunimmt. Histidin ist im Vergleich hierzu bei physiologischem pH neutral zeigt trotzdem eine gute Zinkaffinität, weshalb keine genauere Betrachtung erfolgt.^[184]

| Peptidsequenz | pKs | | | |
|--------------------|---------|---------|---------|---------|
| CP-1 (CCHH) | 7.7 (C) | 8.7 (C) | 6.3 (H) | 6.3 (H) |
| CP-1 (CCHC) | 7.6 (C) | 8.5 (C) | 6.4 (H) | 8.7 (C) |
| CP-1 (CCCC) | 7.6 (C) | 8.1 (C) | 8.7 (C) | 9.1 (C) |
| treble-clef (CCCC) | 6.5 (C) | 7.9 (C) | 9.0 (C) | 9.8 (C) |
| HSP33 (CCCC) | 7.2 (C) | 7.3 (C) | 8.6 (C) | 9.0 (C) |
| Cystein/Histidin | 8.3 (C) | 6.5 (H) | | |

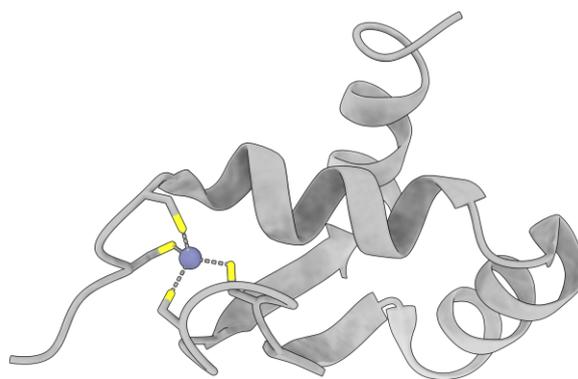


Abbildung 10: Links: Tabellarische Zusammenfassung der pKs-Werte einzelner Zink-bindender Aminosäuren in Zinkfingerpeptiden. CP-1 steht hierbei für den artifiziellen Zinkfinger *consensus peptide* von BERG *et al.*, der in den Studien von LATOUR *et al.* an metallbindenden Positionen modifiziert wurde. Treble-clef und HSP33 sind weitere, vom klassischen $\beta\beta\alpha$ -Zinkfingermotiv abweichende Zinkfingerproteine. Der Vergleich der pKs-Werte zeigt, dass die Umgebung im Protein einen deutlichen Einfluss auf die Acidität der entsprechenden Thiole ausübt, während die Histidine einen pKs-Wert ähnlich der Aminosäure besitzen. Dieser Effekt zeigt seine größte Auswirkung im *treble-clef*-Protein, wodurch die Reichweite der pKs-Werte von 6.5-9.8 ausgeweitet wird. Rechts: Schematische Darstellung des HSP33-Proteins^[185] (PDB: 1XJH) mit seiner Redox-aktiven Seite, wobei nur die Zink-bindenden Cysteine explizit dargestellt sind.

Neben der Zusammensetzung und Anordnung der Zink-bindenden Aminosäuren, besitzt auch der hydrophobe Kern Einfluss auf die Bindungsaffinität zu Zink(II).^[114] Hierzu synthetisierten BERG *et al.* Zinkfingerpeptide, die einen modifizierten minimalen hydrophoben Kern besitzen, in dem sämtliche hydrophobe Reste durch Alanin ersetzt wurden.^[186] Das Resultat ist ein Verlust von sowohl thermodynamischer Stabilität als auch Bindungsaffinität zu Kobalt(II).^[186] Nachdem verschiedene Struktur-Affinitätsbeziehungen aufgestellt wurden, richtete sich der Fokus von mehreren Arbeitsgruppen auf den Faltungsmechanismus. Es konnte bewiesen werden, dass die Zinkbindung eine elementare Funktion einnimmt und bereits in einer frühen Phase des Faltungsprozesses ausgebildet

wird.^[115] Zunächst erfolgt die Koordination beider Thiolgruppen der Cysteine an Zink(II), wodurch die Faltung des β -*hairpins* eingeleitet wird. Dies wird im Anschluss durch die Koordination vom N-terminalen Histidin ergänzt, wobei zeitgleich der hydrophobe Kern ausgebildet wird.^[115] Schlussendlich bindet auch das C-terminale Histidin Zink(II), wodurch eine zusätzliche Stabilisierung der α -Helix erreicht und der Faltungsprozess abgeschlossen wird.^[115,187] Moleküldynamik-Simulationen, die in Kapitel 1.6 genauer betrachtet werden sollen, haben jedoch gezeigt, dass bereits eine Vorfaltung des *turns* bzw. Teile des β -*hairpins* im *apo*-Peptid einsetzt, was den pKs-Wert der Cysteine senkt und eine Deprotonierung erleichtert.^[188] Die Bedeutung des CCHH-Motivs, wird dadurch betont, dass auch weitere Proteine, die in Genregulation involviert sind, dieses Strukturmotiv enthalten.^[189,190]

1.3.4 Zinkfingerpeptide in Gegenwart von weiteren Metall-Ionen

In den vorherigen Kapiteln wurden, neben Studien, die die Affinität von Zinkfingerproteinen gegenüber Zink(II) beschreiben, auch Beispiele genannt, in denen weitere Übergangsmetalle für diese Untersuchungen verwendet wurden. Die Vorliebe für Zink(II) wurde unter anderem an Zinkfingerpeptiden CP-1^[191] und WT1^[192] mit Ramanspektroskopie dargestellt, wobei als Erklärung eine Kombination aus Ligandenfeldstabilisierungsenergie und weiteren thermodynamischen Faktoren wie Metallaffinitäten, und Enthalpie der Hydratationshülle verwendet wurden. Der Austausch von Zink(II)-Ionen mit anderen Metallen, führt häufig zu strukturellen oder funktionellen Schäden in Zinkfingerproteinen, wie gemischte Komplexe, unvollständige Metallkoordinationen oder Ausbildung von Disulfidbrücken durch Oxidation der Cysteine.^[113] Diese Verwundbarkeit des Zinkfingerkerns spiegelt sich auch in der Reaktivität gegenüber Methylierungsreagenzien wieder, die eine irreversible Modifikation des Thionyls hervorrufen können, wobei auch hier die Bindungsaffinität herabgesetzt wird.^[193-196] Nickel(II), Cadmium(II), Blei(II) und Quecksilber(II) sind nur einige Beispiele von Metallen, die in der Lage sind, Zink aus Zinkfingerproteinen teilweise oder komplett zu verdrängen und dadurch die Wirkungsmechanismen, wie z.B. Bindung der DNA zu stören (Abbildung 11).^[114] Hierdurch ergibt sich auch ein Anteil der Toxizität dieser Metall-Ionen.^[135,197-199] So verfügt Blei(II) über die Fähigkeit, selbst aus stabilen Zinkfingerkomplexen Zink vollständig zu verdrängen, was in Kombination mit Neurologischen Erkrankungen gebracht wird, da die DNA-Bindungseigenschaften von "*Bleifingern*" stark eingeschränkt ist.^[200] Zwar werden Kobalt(II) und Cadmium(II) in spektroskopischen Strukturbestimmungen von Zinkfingerproteinen routinemäßig eingesetzt, jedoch beeinflussen auch diese Metall-Ionen im physiologischen Umfeld die DNA-Bindungsaktivität.^[113] Die kontrollierte Anpassung dieser Aktivität kann jedoch auch als Templat für das Design von metallbasierenden Zinkfingerinhibitoren dienen, wie LOUIE *et al.* mit einer Kobalt(III)Schiffschen Base zeigen konnten.^[201]

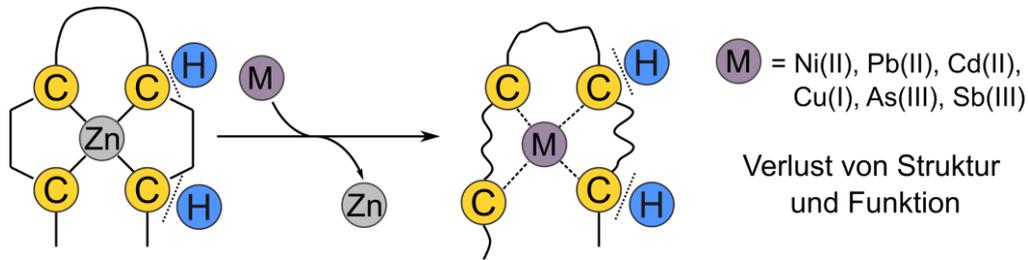


Abbildung 11: Schematische Darstellung, der Verdrängung von Zink aus Zinkfingerproteinen (CCHH, CCCH, CCHC, CCCC) durch weitere Metall-Ionen adaptiert von KLUSKA *et al.*^[113] Eine Vielzahl an Metallen (z.B. Nickel(II), Blei(II), Cadmium(II), Kupfer(I), Arsen(III) und Antimon(III)) sind in der Lage, Zink vollständig aus gefalteten Zinkfingerproteinen zu entfernen und damit einen Zerfall der Tertiärstruktur zu initiieren. Durch den Verlust der Struktur werden bedeutende biologische Prozesse, in denen Zinkfinger involviert sind, unterbrochen, wodurch sich auch ein Teil der Toxizität dieser Metalle ergibt.^[113]

Im Kontrast zu den geringen Applikationen von Nickel(II), Blei(II) und Quecksilber(II) in Zinkfingerproteinen, finden die Edelmetalle Gold und Platin eine breite Anwendung, was sich in der Entwicklung von Medikamenten wie *Aurothioglucose*, *Aurothiomalate* und *Cis-Platin* widerspiegelt.^[202,203] Wichtige Beiträge lieferten FRANZMANN *et al.*, indem gezeigt wurde, dass Gold(I) in der Lage ist, Zink schnell und vollständig zu verdrängen und dabei eine ähnliches Faltungsmuster zu erreichen.^[204] Die Kombination aus Metallreagenz und Reduktionsmittel reguliert, ob zwei Gold(I)-Ionen innerhalb eines Peptids komplexiert werden, oder ob neben einer einfachen Koordination noch eine Disulfidbindung entsteht (Abbildung 12). Die Erforschung der Reaktivität und Stabilität von *Goldfinger* ist wesentlicher Bestandteil der Zinkfingerproteinforschung der letzten Jahre.^[204-209] Die Entdeckung von *Cis-Platin* als Zellwachstum hemmendes Medikament im Jahre 1974 galt als ein Meilenstein im Bereich der Krebsforschung.^[210,211] Auch *Cis-Platin* ist in der Lage, mit Zinkfingerdomänen zu interagieren, wobei Untersuchungen zum genauen Mechanismus enthüllten, dass die Interaktionen unspezifischer Natur sind.^[113] Es ist jedoch bekannt, dass die Wechselwirkungen mit Cystein-reichen Zinkfingerproteinen, wie z.B. der DNA-Polymerase, eine bedeutende Rolle im Wirkungsmechanismus des Medikaments einnehmen.^[212] Als Beispiel für ein Platin-enthaltendes Medikament, das speziell für die Inhibition von *HIV-1 NCp7* Zinkfingerprotein konzipiert wurde, soll das von FARRELL *et al.* entwickelte [Pt(dien)(nucleobase)]²⁺ erwähnt werden (Abbildung 12).^[213,214]

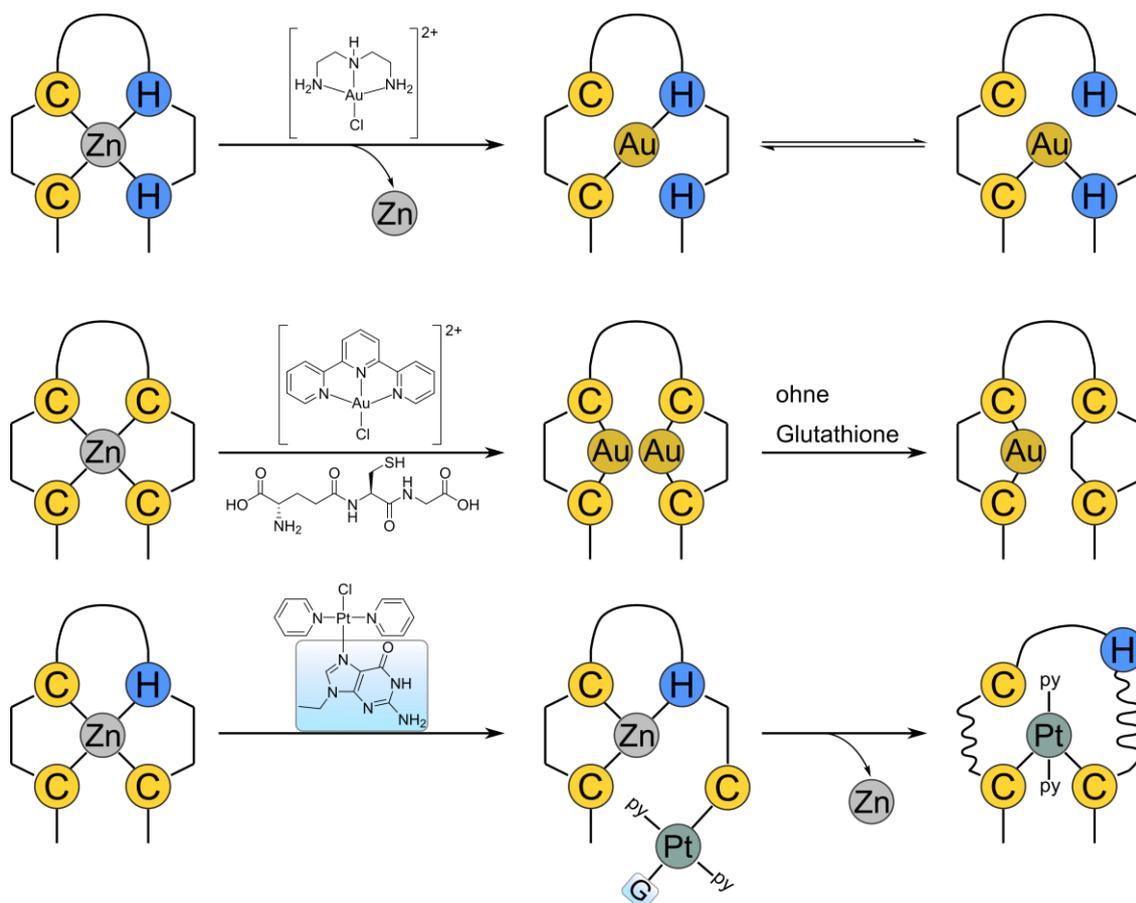


Abbildung 12: Das grundlegende Darstellungskonzept wurde von KLUSKA *et al.*^[113] adaptiert, und zeigt die Verwendung von Edelmetallreagenzien zur gezielten Inhibition von Zinkfingerproteinen. FRANZMANN *et al.* demonstrierten durch die Zugabe von Gold(I)-Reagenzien, die Verdrängung von Zink aus dem Zinkfingermodellpeptiden mit unterschiedlichen Bindungsmotiv, was zur Ausbildung von Goldfingern führt, wobei ein Koordinationsgleichgewicht zwischen den metallbindenden Aminosäuren vorliegt.^[204] Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden Terpyridin-Liganden zur Koordination von Gold verwendet. Diese Reagenzien führten nach Zugabe zum CCCC-Zinkfingerbindungsmotiv zur Darstellung von Goldfingern, die zwei Gold-Ionen komplexieren, wobei das Vorhandensein des Reduktionsmittels Glutathione essenziell zur Unterdrückung einer Disulfidbrücke ist. FARRELL *et al.* erweiterten dieses Konzept auf Platin-basierenden Reagenzien zur gezielten Inhibition von retroviralen Zinkfinger-DNA-Interaktionen.^[214] Als Liganden identifizierten sie, neben Pyridin auch ein Nucleobase-Derivat, was es dem Metall ermöglicht, zunächst an Cystein des CCHC-Bindungsmotivs zu koordinieren um anschließend Zink(II) vollständig zu verdrängen.

1.3.5 Intrinsische Beweglichkeit in Zinkfingern

Untersuchungen der intramolekularen Bewegungen von Proteinen sind ein zentrales Thema in zahlreichen Studien, da sie elementar für biologische Funktionen, wie Enzymkatalyse oder Bindung von Liganden sind.^[215-217] Die systematische Charakterisierung dieser Bewegungen erfordert unterschiedliche analytische Methoden, da die Prozesse auf unterschiedlichen Zeitskalen ablaufen. Dies kennzeichnet jedoch gleichzeitig die Faltung und Funktion eines Proteins.^[51] Typische Bewegungen innerhalb eines Proteins sind z.B. Bindungsschwingungen,^[218] Oszillationen von Seitenketten,^[219] oder gar konzertierte Verschiebungen von gesamten Proteinsegmenten.^[220] Eine nahezu alltäglich verwendete Methode, um die Bewegungen von Proteinen zu untersuchen, ist NMR-Spektroskopie.^[221]

Sie ist in der Lage, Bewegungen auf atomarer Ebene, auf einer breiten Zeitskala von Pikosekunden bis Stunden, zu betrachten. Hervorzuheben sind Messung von Relaxationsraten,^[222] Magnetisierungstransfer^[223] und Isotopen-Austausch-Experimente.^[224] Die Relaxationsraten einzelner Atome von Aminosäuren sind abhängig von den internen Translationen und Rotationen des Peptidrückgrats und der Seitenketten. WRIGHT *et al.* nutzten wenige Jahre nach Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Zinkfingern diese Methode, um Beweglichkeiten des *Xfin-31* Zinkfingerpeptids aufzuklären.^[225] Das Rückgrat des Peptids zeigt, mit Ausnahme des *loops*, der die α -Helix und das β -sheet verknüpft, eine hochgradige Einschränkung bezüglich der Beweglichkeit, die zusätzlich mit der Auswertung von NOE-Kontakten übereinstimmt.^[225] Jedoch wurde bereit früh erkannt, dass die NMR-Struktur ein statisches Bild beschreibt und somit nur einen kleinen Teil der Beweglichkeit des Zinkfingers abbildet. Relaxationsmessungen der Zinkbindungsseite, enthüllen große *Spin-Spin* Raten, was auf einen konformationellen Austausch hindeutet.^[226] Gleichzeitig wirkt dieser Einfluss jedoch nur auf einen der Kohlenstoffe im Histidin.^[226,227] Neben dem Rückgrat des Peptids wurden die Relaxationsmessungen auch auf die Seitenketten ausgeweitet.^[227] Während das Gros der Seitenketten eine ähnliche Dynamik wie das Rückgrat besitzt, gibt es zwei Aminosäuren, die eine eingeschränkte Beweglichkeit aufweisen. Sowohl Phenylalanin als auch Leucin, die den hydrophoben Kern von *Xfin-31* ausbilden, sind, auf der Zeitskala von Pikosekunden bis Nanosekunden, nahezu starr um ihre χ_2 -Torsion.^[227] Diese Einschränkung reflektiert ihre dichte Packung im hydrophoben Kern. Die Autoren merken jedoch an, dass diese Ergebnisse im Widerspruch zum ¹H-Spektrum des Zinkfingers steht, in dem nur ein AA'BB'C-Spinsystem beobachtet werden konnte (Abbildung 13).^[227] Die Drehung des aromatischen Rings erfolgt daher auf einer Zeitskala, die im Vergleich zu den Rotationsbewegungen langsam, jedoch im Vergleich zur chemischen Verschiebungsdifferenz zwischen symmetrischen Spins, schnell sein muss.^[227]

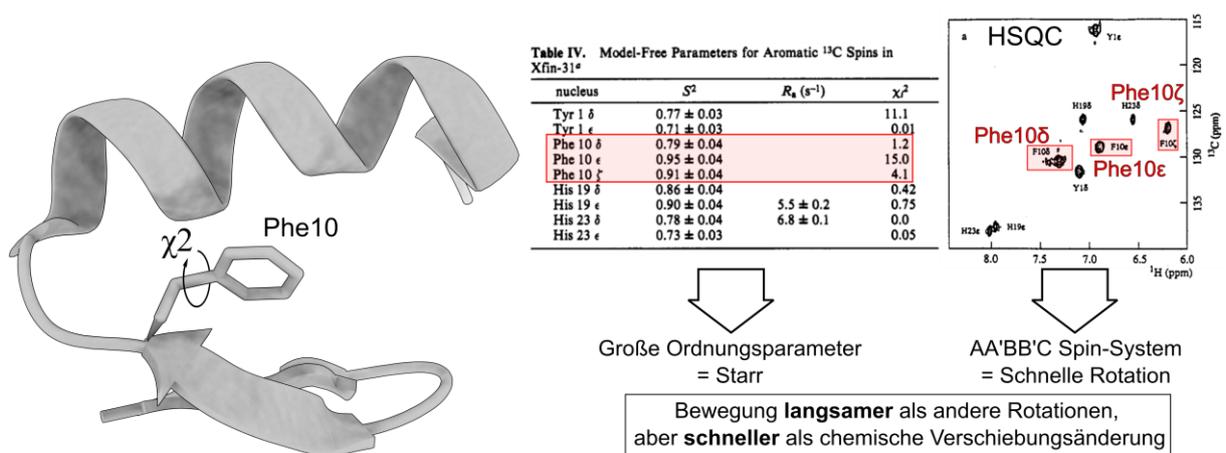


Abbildung 13: Links: Schematisches Abbild des *Xfin-31* Zinkfingerpeptids (PDB: 1ZNF)^[101] mit expliziter Darstellung der zentralen Aminosäure des hydrophoben Kerns. Da die NMR-Struktur nur ein statisches Bild liefert, führten WRIGHT *et al.* Relaxationsmessungen durch (Tabelle rechts),^[227] um einen Einblick in die Beweglichkeit der Seitenketten zu erhalten. Die großen Ordnungparameter deuten auf eine eingeschränkte Beweglichkeit von Phe¹⁰ hin. Das HSQC-Spektrum^[227] hingegen zeigt ein AA'BB'C Spin-System, was nur durch eine schnelle Rotation des aromatischen Rests von Phe¹⁰ möglich ist.

Nachdem die Bewegungen von einzelnen Zinkfingerdomänen beschrieben wurde, richtete sich der Fokus auf Zinkfingerproteine mit mehreren Domänen.^[228] WRIGHT *et al.* verwendeten *anisotropic tumbling* um die Flexibilität der ersten drei Zinkfinger in *TFIIIA* aufzuklären. Wie bereits erwähnt, können einzelne Zinkfingerdomäne linear aneinander verknüpft werden, jedoch ist ihre Beweglichkeit hoch korreliert, wodurch die gemittelte Konformation des Zinkfingerpolypeptids gestreckt ist.^[228] Dies steht im Widerspruch zu den Untersuchungen von NEUHAUS *et al.*, die eine strukturelle Unabhängigkeit zwischen einzelnen Zinkfingerdomänen feststellten.^[138] Der Grund lässt sich an dem unterschiedlichen Fokus der beiden Studien identifizieren, da NEUHAUS *et al.* an der generellen Struktur von Zinkfingerpeptiden interessiert waren, während WRIGHT *et al.*, aufbauend auf diesen Ergebnissen die Beweglichkeit analysierten.^[228]

1.3.6 Biologisch relevante Prozesse von Zinkfingern - DNA-Bindung und Protein-Protein-Interaktionen.

Zwar kennzeichnete 1989 das Jahr, in dem die dreidimensionale Struktur von Zinkfingerproteinen und ihre allgemeinen Interaktionen mit DNA-Segmenten etabliert wurde, dennoch fehlte eine genaue Beschreibung der geometrischen Ausrichtung des Protein-DNA-Komplexes. 1991 gelang es PABO *et al.* das drei-Finger enthaltenden Zinkfingerprotein *Zif268*, gebunden an DNA zu kristallisieren.^[229] Die drei α -Helices führen die Hauptwechselwirkungen zur DNA durch, indem sie sich entlang der *major groove* ausrichten. Dabei werden hydrophobe Kontakte bzw. Wasserstoffbrückenbindungen mit GC-reichen Regionen gebildet.^[229] *Zif268* windet sich innerhalb einer Umdrehung vollständig um die DNA und ermöglicht so, den Aminosäuren der α -Helix, genauer Position -1, 2, 3 und 6, die Ausbildung von Wechselwirkungen.^[229] Eine zusätzliche Stabilisierung erfolgt durch den Kontakt zwischen Lysin-Seitenketten und dem Phosphatrückgrat der DNA. Die Kombination dieser Wechselwirkungen definiert das Bindungsmuster von *Zif268*.^[229] Der erste Zinkfinger bindet die 5'-GCGT-3' Sequenz, während Zinkfinger-2 mit dem 5'-TGGG-3' Abschnitt interagiert. Der dritte Zinkfinger wiederum bindet erneut an 5'-GCGT-3' und schließt das Bindungsmuster, welches kanonisches Docking Arrangement genannt wird und auch bei anderen Zinkfingerproteinen beobachtet werden kann, ab.^[230,231] Zwar lässt sich Anhand der Struktur, eine Voraussage für das DNA-Bindungsmuster treffen, jedoch zeigten Studien am *Drosophila CF2*-Zinkfingerprotein, dass durch punktuelle Mutationen auch AT-reiche DNA-Stränge komplexiert werden können.^[232] Als Auslöser konnte der Winkel zwischen α -Helix des Zinkfingerpeptids und DNA identifiziert werden, der zu nicht spezifischen hydrophoben Kontakten und flexiblen Wasserstoffbrückenbindungen mit anderen Basenpaaren führt.^[66,233,234] Bereits in frühen Untersuchungen war es ersichtlich, dass klassische $\beta\beta\alpha$ -Zinkfingerproteine erst ab mehreren Zinkfingerdomänen in der Lage sind, DNA zu binden.^[234] Jedoch sind einzelne Zinkfingerpeptide in der Lage, Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln, was am Beispiel von *FOG-I/GATA-I* deutlich wird, die als am besten charakterisierten Protein-Protein-Interaktionen gelten.^[235] *FOG-I*, dessen Abkürzung

friend of GATA-1 bedeutet, ist essenziell für den korrekten Biomechanismus von *GATA-1* und bindet diesen Transkriptionsfaktor mit seinem CCHC Bindungsmotiv.^[236-238] Eine Mutation zum CCHH-Motiv, wie es dem klassischen Zinkfinger entspricht, führt zum Verlust der Bindungsaffinität.^[239] Als weiteres Beispiel zu PPI zwischen Cys₂His₂-Domänen soll *Gliom*-assoziiertes Protein 1 (*Gli-1*) genannt werden, das zeitgleich eines der zuerst entdeckten PPI bei Zinkfingern darstellt.^[240] *Gli-1* ist aus fünf Zinkfingerdomänen zusammengesetzt, wobei jeweils unterschiedliche biologische Funktionen zu beobachtet sind. PABO *et al.* postulierten, dass zwischen Finger eins und zwei, intramolekulare PPI stattfinden, während die Finger zwei bis fünf in DNA-Wechselwirkungen involviert sind.^[240] Hervorzuheben ist, dass Finger drei bis fünf zusätzlich in der Lage sind, Protein-Protein-Wechselwirkungen einzugehen, wobei der genaue Mechanismus weiterhin Thema aktueller Untersuchungen ist.^[241-243] Diese Mannigfaltigkeit an Funktionen ist in vielen Zinkfingerproteinen vorhanden und wird, im Folgenden, am *Yin Yang 1* (*YY1*) Protein, dessen Name bereits seine entgegengesetzte Wirkungsweise verdeutlicht, behandelt (Abbildung 14). *YY1* ist aus vier Cys₂His₂-Zinkfingern zusammengesetzt und bindet an verschiedene Gene, um die Expression von Genen einzuleiten oder zu unterdrücken.^[244,245] Es gehört zur Gruppe der GLI-Krüppel Zinkfingerproteine^[246,247] und zeigt eine außergewöhnlich hohe Primärstrukturkonservierung in der DNA-bindenden Domäne, zwischen Maus, Krallenfrosch und Mensch.^[245,248] Im Gegenzug weist die N-terminale Region eine größere Diversität zwischen den Arten auf.^[249]

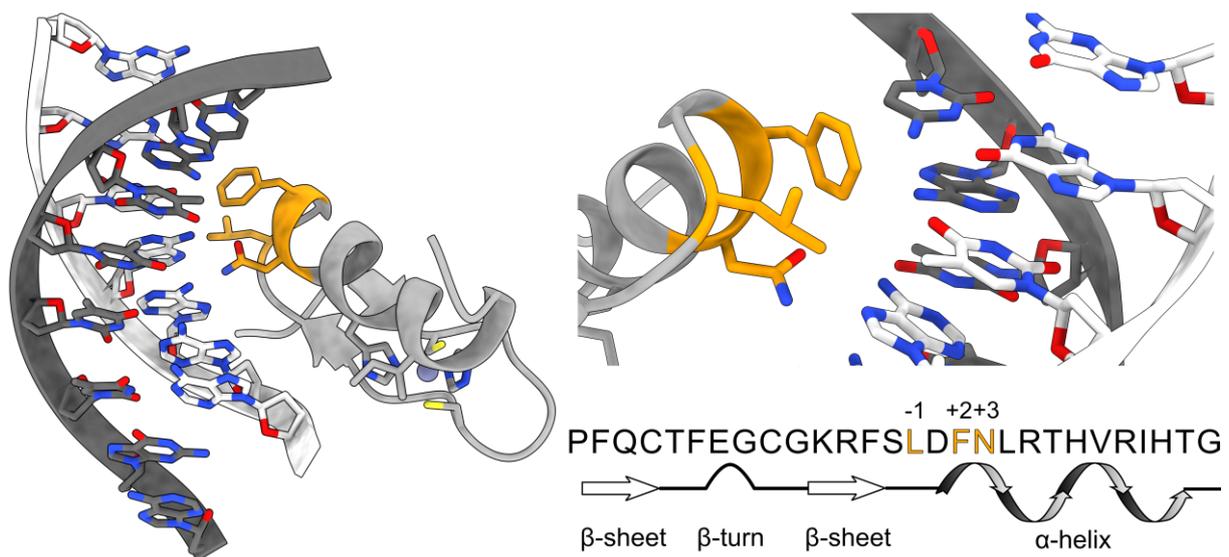


Abbildung 14: Links: Ausschnitt aus der Kristallstruktur von HOUBAVIY *et al.*^[250] den es gelang, das Yin-Yang1-Protein in Gegenwart eines DNA-Segments zu kristallisieren. Die DNA-Interaktionen des dritten Fingers von Yin-Yang1 (3YY1), die über die Positionen -1, +2 und +3 der α -Helix fasilitiert werden, sind in orange gekennzeichnet. Unten rechts: Sequenz des abgebildeten Zinkfingerpeptids in Kombination mit den Sekundärstrukturelementen.

Die Aminosäuren der DNA-Bindungsdomäne, die spezifisch die 5'-CAT-3'-Sequenz erkennt, befindet sich am C-Terminus und wurden durch Kristallstrukturanalyse von HOUBAVIY *et al.* aufgeklärt (Abbildung 14).^[250] Anschließend folgen zwei, teils überlappende, Unterdrückungsdomänen, die für die Rekrutierung von *Histon-Deacetylasen* (*HDACs*) verantwortlich sind.^[251] Gleichzeitig enthält *YY1* aber

auch eine zweiteilige Aktivierungsdomäne, die am N-Terminus angesiedelt ist und aus einer acidischen und Glutamin-Prolin reichen Region besteht.^[252] Trotz der zahlreichen intensiven Studien in den vergangenen Jahren, sind nicht sämtliche Funktionen der Domänen entschlüsselt.^[253] So besitzt *YYI* auch eine Glycin-reichen Region und eine, mit elf aneinandergereihten Histidinen, äußert basischen Domäne, die beide in der Proteinvariante des Krallenfrosches nicht vorkommen und somit auf eine Bedeutung im menschlichen Körper hinweisen.^[252,254] LEE *et al.* entfernten diese Histidin-reiche Region und führten Affinitätsstudien durch, konnten aber keinen Einfluss auf die Hemmungsfähigkeiten von *YYI* feststellen.^[255] Die Natur nutzt eine Vielzahl an posttranslationalen Modifikationen, um biologische Prozesse zu initiieren, regulieren oder abzuschließen und auch *YYI* ist zugänglich für diese Modifikationen. Dies beinhaltet zum Beispiel Phosphorylierung, Acetylierung, Glykosylierung und Ubiquitinierung von Seitenketten, wobei Lysin häufig involviert ist.^[253] Die Phosphorylierung von *YYI* führt zu stabilen Phospho-Proteinen und kann die DNA-Bindungsfähigkeit regulieren, während glycosilierte *YYI*-Proteine unfähig sind Wechselwirkungen mit Retinoblastom-Proteinen durchzuführen.^[256-258]

1.4 Kovalente Verknüpfung in biologischen Makromolekülen - die Disulfidbrücke

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, benötigen Zinkfingerproteine Cystein als metallbindende Aminosäuren, um Zink tetraedrisch zu koordinieren. Hierzu ist zunächst die Deprotonierung der entsprechenden Thiole zum Thiolat notwendig. Neben der Metallkomplexierung ist die Oxidation zur Disulfidbrücke mit einem weiteren Thiol ein zusätzlicher Reaktionspfad, den Cystein in physiologischer Umgebung eingehen kann.^[259] Während diese Reaktion in Zinkfinger zum Verlust der Struktur und damit ihrer Funktion führt,^[260] gibt eine Vielzahl an Proteinen, die Disulfide für die Stabilisierung ihrer Tertiärstruktur benötigen. Proteine mit natürlichen Disulfidbrücken lassen sich vorzugsweise in extrazellulärer Umgebung finden, da der reduktive Charakter im Cytosol eine Oxidation verhindert. Dies ist auch notwendig, da für den Transport von Proteinen durch Membranen meist die ungefaltete Struktur benötigt wird.^[261] Zudem müssen gewisse Anforderungen an die räumliche Anordnung der Cysteine im Protein gegeben sein, damit eine Bindung zum Disulfid vollzogen werden kann. Um eine selektive Bindung zu ermöglichen, verwendet die Natur Hilfsproteine wie zum Beispiel die Protein-Disulfid-Isomerase, welche selbst zunächst von einem weiterem Enzym oxidiert werden muss.^[262] Da Disulfidbrücken die einzige natürliche kovalente Bindung zwischen mehreren Peptidsträngen darstellen, bedürfen sie einer genaueren Betrachtung. Die Charakteristika einer Disulfidbrücke wurden 1981 von THORNTON *et al.* durch die Analyse von 55 Disulfiden in verschiedenen Proteinen beschrieben und wenige Jahre später durch PETERSEN *et al.* ergänzt (Abbildung 15).^[263,264] Sie zeigten eine Bindungswinkelverteilung von 114° für $C\alpha-C\beta-S\gamma$ und 105° für $C\beta-S\gamma-S\gamma'$, während Analysen der χ_3 -Torsion ($C\beta-S\gamma-S\gamma'-C\beta'$) eine Bevorzugung für zwei enge Bereiche um -87° und 97° enthalten. Die Torsionsstabilität ist von großer Bedeutung, da schon leichte Abweichungen von den Idealwerten zu

mehreren kcal/mol Stabilitätsverlust führen.^[265,266] Die Untersuchungen von natürlich vorkommenden Disulfiden in Proteinen, legte den Grundstein für das gezielte Entwerfen solcher stabilisierenden Bindungen. Einer der ersten Erfolge für solch gezieltes Design an Proteinen, konnten PERRY *et al.* am Lysozym T4 erzielen, das zwar über zwei Cysteine in der Sequenz verfügt, die jedoch aufgrund räumlicher Restriktionen nicht in der Lage sind, eine Disulfidbrücke auszubilden (Abbildung 15).^[267] Durch die Mutation von Isoleucin³ zum entsprechenden Cystein und anschließender Oxidation, konnte eine Disulfid gebildet werden, dass zu einer deutlichen Steigerung der thermischen Stabilität von Lysozym T4 kumulierte.^[267] Durch diese und Folgestudien konnten Richtlinien aufgestellt werden, die den erfolgreichen Einbau von stabilisierenden Disulfidbrücken erlaubten. Um den größtmöglichen stabilisierenden Effekt zu erzielen, sollten die Disulfide an Positionen von flexiblen Regionen lokalisiert sein und vorzugsweise einen großen *loop* erzeugen.^[268-270]

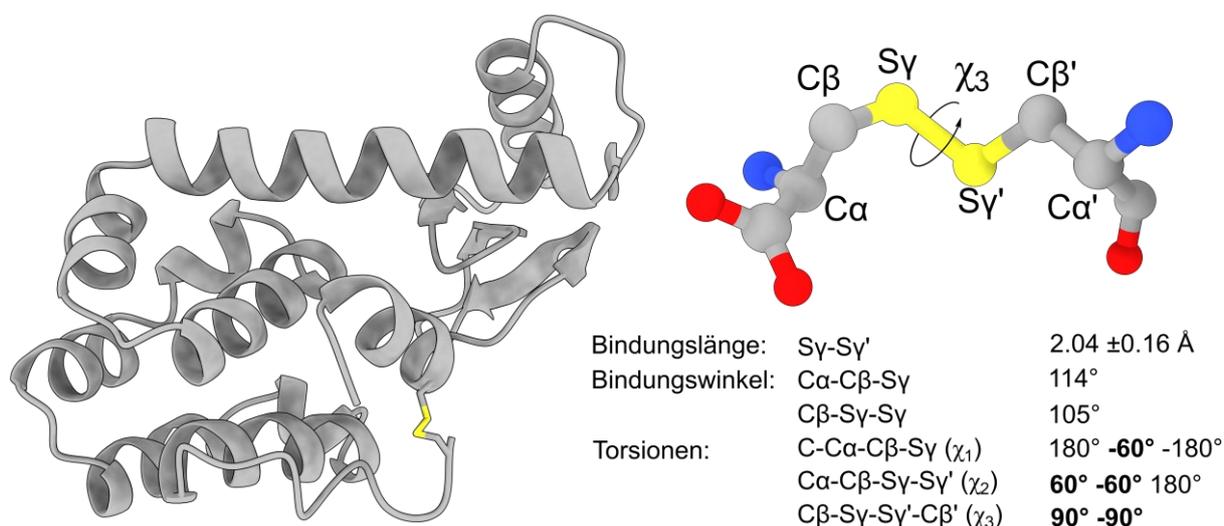


Abbildung 15: Links: Tertiärstruktur des, von PERRY *et al.*^[267] modifizierten, Lysozym T4 (PDB: 1L35)^[271] mit explizit dargestellten Disulfidbrücke. Die Charakteristika dieser Bindung sind auf der rechten Seite dargestellt. Hervorzuheben ist die geringe Flexibilität von χ_3 , die auf zwei enge Bereiche von 90 und -90° eingeschränkt ist und durch Analysen von Proteinstrukturdatenbanken von THORNTON *et al.*^[263] und PETERSEN *et al.*^[264] charakterisiert wurden.

Im eingeschränkten Fall können diese Regeln auch auf kleinere Systeme, wie Peptide übertragen werden, was durch Studien zu β -*hairpins* von SCHRIMPF *et al.* gezeigt werden konnte.^[88] Unter anderem führt die Mutation von einer N- und C-terminalen Aminosäure durch Cystein und anschließender Oxidation eines Peptids, basierend auf der Kombination von dem COCHRAN-Kluster^[272,273] und ein Teil der Fillagrinsequenz,^[274] zur Stabilisierung und Ausprägung eines wohl-definierten β -*hairpins* mit zwei Disulfiden, der als Epitop für Antikörpererkennung fungieren kann.^[88] Um festzustellen, ob die Ringgröße des Bi-Disulfids, oder der hydrophober Cluster, einen größeren Einfluss auf die Faltung des *hairpins* ausübt, entfernten SCHRIMPF *et al.* zwei Aminosäuren und reduzierten die Struktur auf ein 12mer-Peptid (Abbildung 16).^[275] Entgegen den Erwartungen, wurde kein monomeres Bi-Disulfid beobachtet, sondern eine, über die N- und C-terminalen Cysteine zum 24mer-Peptid, Dimerisierung zum neuen Epitop wurde vollzogen. Selbst bei niedrigeren Konzentrationen konnte nur diese selektive

Dimerisierung beobachtet werden, was auf zusätzliche stabilisierende Effekte im *hairpin*-Segment hindeutet.^[275] Untersuchungen der Kettenlängen durch den Einbau von 6-Aminohexansäure als *spacer* am N-Terminus führten dazu, dass kein Dimer beobachtet werden konnte, was auf eine elementare Bedeutung der Kettenlänge für die Ausbildung des Dimers hindeutet.^[275] Während die Monomere im ¹H-NMR klar definierte Signale zeigten, konnte für das Dimer teils erhebliche Signalverbreiterung beobachtet werden, die keine Abhängigkeit von der Konzentration demonstrierte und somit nicht auf Aggregation zurückgeführt werden konnte. Als einziger plausibler Mechanismus wurde die scharnierartige Bewegung des Peptidrückgrats postuliert, die eine solch hohe Energiebarriere besitzt, dass ein schneller Austausch bei Raumtemperatur nicht möglich ist.^[275] Nicht nur designte, synthetische Peptide sind in der Lage Homodimerisierungen einzugehen, sondern ein, in der Natur vorkommendes prominentes Beispiel ist die prolinreichen Scharnier-Region (CPPC) des *Immunglobulin*.^[276] In diesem Fall sind zwei schwere Antikörperketten, über zwei, oder im Falle von IgG₂ und IgG₃, mehrere Disulfidbrücken miteinander verknüpft.^[277,278] Weiterhin ist die Zusammensetzung des Scharnier-Abschnitts von zentraler Wichtigkeit für die Flexibilität des Antikörpers, sowie seiner Tendenz zur Disulfidisomerisierung.^[279,280] Zur genaueren Untersuchung dieser Flexibilität synthetisierten KESSLER *et al.* und MORODER *et al.* Scharnier-Peptide, um konformationelle Untersuchungen mit NMR-Spektroskopie und Moleküldynamik-Simulationen durchzuführen (Abbildung 16).^[281-283] Ihre Analysen enthüllten, dass die Kernregion des Scharnier-Peptids aus zwei parallelen Polyprolin-II-Helices besteht, die durch eine linksgängige und rechtsgängige Disulfidbrücke verbunden sind. Im Gegensatz zu weiteren Studien stellten die Autoren keinen Zusammenhang für die Beweglichkeit des Scharnier-Peptids zum Inneren des Kerns her, sondern beschreiben die C-terminalen Aminosäuren als treibende Kraft für die Flexibilität.^[281]

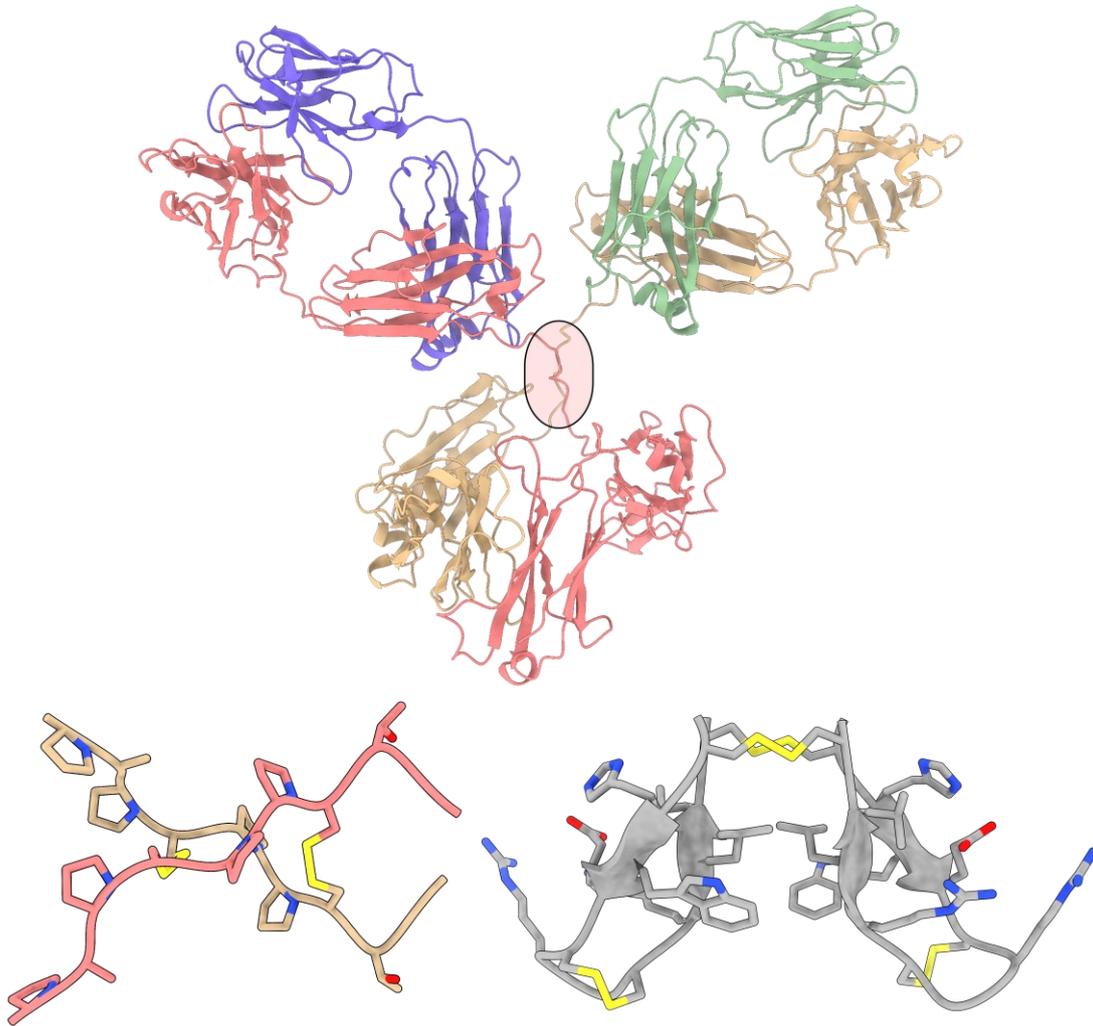


Abbildung 16: Oben: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur von IgG1 (PDB 1IGY).^[284] Der hervorgehobene Bereich kennzeichnet die Scharnier-Region des Antikörpers. Die isolierte Betrachtung (links unten) dieses Bereichs wurde von MORODER *et al.*^[281] durchgeführt, die unter Verwendung von NMR-Spektroskopie und Moleküldynamik-Simulationen die Beweglichkeit der Scharnier-Region charakterisierten. Rechts unten: Ein synthetisches, antiparalleles Scharnier-Peptid, das von SCHRIMPF *et al.*^[275] entwickelt wurde. Die spontane Dimerisierung durch Oxidation der Cysteine des Monomers führt ausschließlich zum abgebildeten Polypeptid, ohne die Anwesenheit von weiteren Oligomeren.

1.5 NMR-Spektroskopie als Methode zur Strukturbestimmung

Zu einem frühen Zeitpunkt in der Geschichte der Biomoleküle war bekannt, dass es für ein ansatzweise vollständiges Verständnis über Funktion und Eigenschaften, die lückenlose Aufklärung der dreidimensionalen Struktur bedarf.^[285,286] Neben der Kristallographie, ist NMR-Spektroskopie eine der wertvollsten Methoden zur Bestimmung der drei-dimensionalen Struktur von Biomolekülen, da sie atomar aufgelöste Informationen, in Lösung und Feststoff liefern kann. Die Bedeutung dieser Methodik wird durch die Verleihung des Nobelpreis an WÜTHRICH für *NMR-Untersuchungen von Struktur und Funktion biologischer Makromoleküle* im Jahr 2002 hervorgehoben.^[287] Eine Besonderheit der NMR-Spektroskopie liegt darin, dass nicht nur die Zusammensetzung (Konstitution und Konformation) von Biomolekülen, sondern auch dynamische Prozesse untersucht werden können. Zwar enthält ein

eindimensionales ^1H -Spektrum eine enorme Aussagekraft, jedoch erst durch die Kombination mehrerer Dimensionen, entfaltet die NMR-Spektroskopie ihr volles Potenzial bei der Strukturaufklärung von biologischen Makromolekülen.^[288] Dieser Umstand rührt daher, dass die entsprechenden Kerne sehr sensitiv zu ihrer chemischen Umgebung sind, die nicht nur über skalare Wechselwirkungen (entlang einer Bindung), sondern auch durch räumliche Anordnungen im Peptidgerüst beeinflusst wird.^[288] Da NMR-Spektroskopie dynamische Prozesse aufklären kann, liefert auch die Einschränkung durch eine stabile Peptidfaltung zusätzliche chemische Differenzen. Dies ist auch notwendig, da die Komplexität von Peptiden und Proteinen durch eine hohe Signaldispersion kompensiert werden muss, um vollständige Zuordnungen zu ermöglichen.^[289] Anschließend können ausgehend von dieser Zuordnung Kern-OVERHAUSER-Effekte genutzt werden, um räumliche Informationen über die Struktur des Peptids zu erhalten.^[290] Auf Basis dieser Kontakte, werden NMR-Strukturensembles mit einer hohen Auflösung erstellt, sodass diese analog zur klassischen Proteinkristallografie verwendet werden können (Abbildung 17).^[291-294] Seit der ersten NMR-spektroskopischen Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines globulären Proteins, dem *Stier-Sperma-Protease-Inhibitor* (BUSI), im Jahr 1985,^[295] hat die Strukturaufklärung mit NMR-Spektroskopie stetig an Bedeutung gewonnen. Gerade zu Beginn, als Kristallografie die Methode der Wahl, zur strukturellen Aufklärung von Biomolekülen war, wurde NMR-Spektroskopie mit großen Vorurteilen begegnet. Als jedoch WÜTHRICH *et al.* in Kooperation mit HUBER *et al.* die Struktur des α -Amylase-Inhibitors *Tendamistat* mit NMR-Spektroskopie aufklärten und diese nahezu identisch mit der kristallografisch bestimmten Struktur von HUBER *et al.* war, wurden diese Vorurteile begraben.^[296,297]

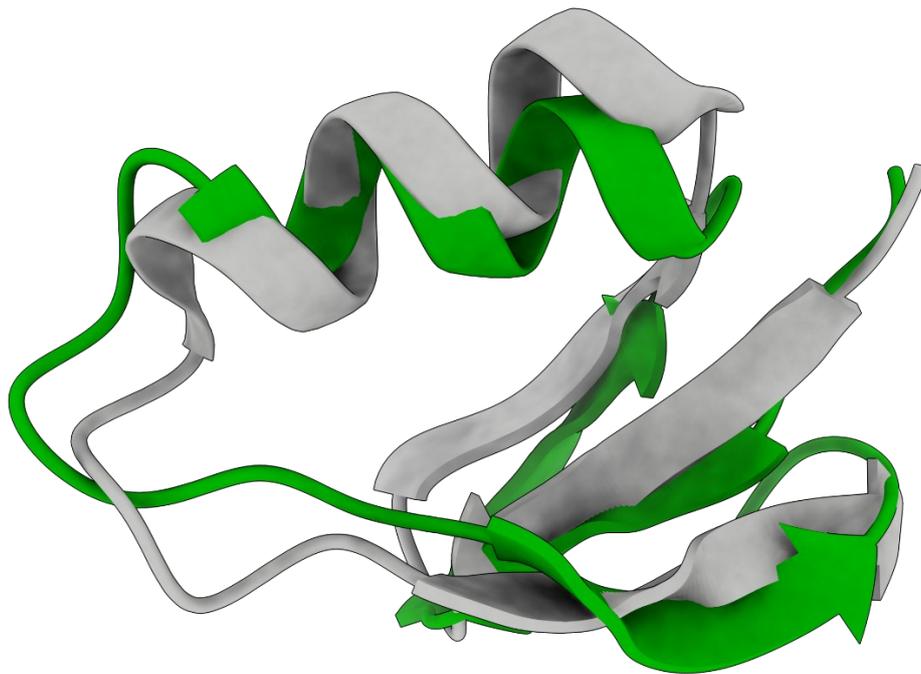


Abbildung 17: Vergleich der Tertiärstruktur des Stier-Sperma-Protease-Inhibitors (BUSI), aufgeklärt von WÜTHRICH *et al.*^[295] (grau, PDB: 1BUS) und HUBER *et al.*^[298] (grün, PDB: 1TGS). Letztere verwendete dabei Kristallografische Methoden, während die Struktur in grau in Lösung durch NMR-Spektroskopie ermittelt wurde. Generell ist eine geringe Abweichung beider Strukturen von 1.3 Å (RMSD) zueinander ersichtlich und demonstrierte 1985 das Potenzial, das NMR-Spektroskopie für die Strukturaufklärung von Proteinen enthält.

Ein weiterer Vorteil der NMR-Spektroskopie liegt in ihrer Fähigkeit, Systeme in Lösung zu untersuchen. Durch gezieltes Anpassen der Parameter (Lösungsmittel, pH-Wert, Salzkonzentration, Temperatur) können physiologische Bedingungen mit einer hohen Genauigkeit simuliert werden.^[287] Dies ist auch notwendig, um korrekte Schlüsse auf Struktur-Wirkungsmechanismen zu erlangen und unnatürliche Peptid-Lösungsmittel-Wechselwirkungen auszuschließen, die im schlimmsten Fall zur Denaturierung des Peptids führen können.^[289] Für die Messungen in der NMR-Spektroskopie sind Lösungsmittel mit einem hohen Deuteriumanteil unabdingbar, um eine hohe Qualität der Signale zu gewährleisten. Zudem liegen Peptide beziehungsweise Proteine, in wässrigem Milieu, in einer Konzentration von geringen Millimol vor, was bei einem nicht deuterierten Lösungsmittel, einem Konzentrationsverhältnis von 11.000 zu 1 entspricht.^[289] Auch die Verwendung von reinem Deuteriumoxid ist für die Aufklärung von Peptiden unzureichend, da die Amidprotonen, durch ihren partiellen Doppelbindungscharakter, eine gewisse Acidität besitzen und mit dem Lösungsmittel ein chemischer Austausch stattfinden würde, was zu einem Signalverlust führt.^[299] Da die Geschwindigkeit des Austausch von der Zugänglichkeit zum Lösungsmittel abhängt, die wiederum von der dreidimensionalen Struktur beeinflusst wird, können Amidprotonen identifiziert werden, die in Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Peptids involviert sind.^[289] Es ist daher notwendig, auf reines Deuteriumoxid für die vollständige Zuordnung von Biomolekülen zu verzichten und in wässrigen Puffersystemen zu arbeiten. Um die geringe Peptidkonzentration zu kompensieren, erfolgt eine selektive Unterdrückung des Wassersignals, ohne die Intensität der Peptidsignale zu stark zu verändern.^[300] Einige prominente Vertreter sind *Presat*, *Excitation Sculpting*, *Flip-back* und *WATERGATE*, wobei sich letzteres als Methode der Wahl, in vielen Forschungsgruppen, etabliert hat.^[301-304] Die Pulssequenz der *WATERGATE*-Methode ist in der folgenden Abbildung 18 aufgezeigt und beschrieben.

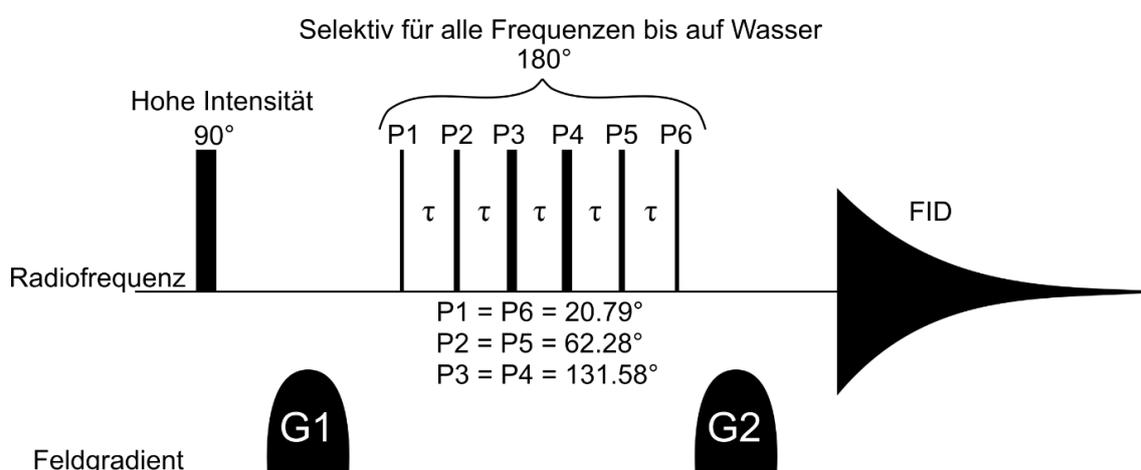


Abbildung 18: Die Pulssequenz der WATERGATE-Methode (WATER GrAdient Tailored Excitation) beruht auf dem Gradienten-Spin-Echo, bei der zunächst die Transmitter-Frequenz exakt auf die Wasserresonanz eingestellt wird. Ein unselektiver, intensiver 90°-Puls wird von einem Gradientenpuls (G1) abgelöst und besitzt den Effekt einer Spin-Spin-Defokussierung. Anschließend folgen sechs kurze, intensive Pulse (P1 bis P6), die in Summe einen 180°-Puls widerspiegeln und selektiv auf alle Resonanzen bis auf Wasser einwirken. Der darauffolgende Gradientenpuls (G2), der in seinen Parametern G1 entspricht, defokussiert das Wassersignal weiter und refokussiert andere Spins. In Summe wirken P1-P6 und die beiden Gradientenpulse auf alle Signale bis auf die Wasserfrequenz und nehmen somit die Rolle ein Spin-Echos ein. Abschließend wird der FID nach Unterdrückung der Wasserresonanz detektiert.

1.6 Computergestützte Simulation von Moleküldynamiken

1.6.1 Historischer Abriss

Wie im Kapitel 1.5 gezeigt wurde, können durch die Verwendung von mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie die Struktur und dynamische Prozesse von Proteinen, in Lösung, aufgeklärt werden. Die hierdurch erhaltenen Strukturen gleichen jedoch im besten Fall nur einer photographischen Abbildung und besitzen daher nicht die Fähigkeit, dynamische Prozesse gänzlich aufzuklären.^[305] Dennoch bieten sie ideale Ausgangspunkte, um theoretische Studien, in Form eines molekularen Videos, mit Computersimulationen durchzuführen. Dieses Kapitel widmet sich der Zusammenfassung von Simulationsmethoden und Teile ihrer Anwendung für biologische Makromoleküle. Gemäß dem Aufbau der bisherigen Einleitung, soll zunächst ein kurzer Überblick der Historie von Moleküldynamik-Simulation aufgeführt werden.

Moleküldynamiksimulation (MD) ist eine Computermethode, die als Untersuchung von Atomen und Molekülen auf der Basis der klassischen Mechanik angesehen werden kann.^[306] Jedes Atom in einer *all-atom*-Simulation wird als ein, oder mehrere, Partikel betrachtet und die Wechselwirkungen zwischen diesen Objekten wird durch eine Reihe von, meist empirisch-bestimmten, Kraftfeldern beschrieben. Die Berechnung der Kraft erfolgt als die erste negative Ableitung der potenziellen Energie, bezogen auf die Atomkoordinaten.^[307] Anschließend werden Positionen und Geschwindigkeit jedes Partikels angepasst, nach NEWTONS Gesetz der Bewegung (Gleichung 1).^[308] Um unrealistische Ergebnisse zu vermeiden, wird die Gleichung der Bewegung, jeweils nach einem bestimmte Zeitschritt integriert, der limitiert wird von der schnellsten Bewegung im System.^[307] Die dadurch erhaltene Trajektorie, kann als ein dreidimensionaler Film der Bewegungen des Systems betrachtet werden und enthält Informationen über Struktur, Dynamik und Interaktionen innerhalb des Modellsystems.^[306] Zusätzlich können, falls diese Eigenschaften auch experimentell bestimmbar sind, Validierungsvorgänge durchgeführt werden, was ein enormes Potenzial birgt, für die Voraussage von nicht experimentell verfügbaren Eigenschaften.^[309] Da eine MD-Simulation auf der Erkundung der konformationellen Energiefläche des Biomoleküls beruht, können neue Wege bei Prozessen wie Proteinfaltung/Entfaltung und Aggregation identifiziert werden.^[306,310] Dennoch soll erwähnt bleiben, dass die Effektivität von Simulation stark von ihrer engen Verknüpfung zu experimentellen Untersuchungen abhängt und die daraus gewonnenen Erkenntnisse, sowohl den experimentellen, als auch den theoretischen Wissenschaftler voranbringen können.^[309,311-313312]

$$\frac{\delta^2 x_i}{\delta t^2} = \frac{F_i}{m_i} \quad (1)$$

Gleichung 1: Bewegungsgleichung nach NEWTON, die auch in der Moleküldynamik-Simulation ihre Anwendung findet. Es erfolgt die zweite Ableitung der Partikelpositionen (x_i) nach der Zeit (t). Dies hat neben der Masse der Partikel (m_i) Auswirkungen auf die Kraft (F_i), die auf die Teilchen wirkt.

Erste MD-Simulationen wurden für die Untersuchung der Wechselwirkungen von Gasen als „harte Sphären“ im Jahre 1957 von WAINWRIGHT *et al.* beschrieben.^[314] Genau zwei Dekaden später, folgte die erste 9.2 Pikosekunden „lange“ MD-Simulation eines Proteins, im Vakuum, dem BPTI.^[315] 1988 wurde BPTI erneut innerhalb einer 210 Pikosekunden langen MD-Simulation untersucht, jedoch konnte dieses Mal die wässrige Umgebung explizit modelliert werden.^[316] Einer der größten Motivationsfaktoren für die Durchführung von MD-Simulationen, war die Entdeckung struktureller Fragmente wie α -Helix, β -sheet oder Doppelhelix von DNA.^[6,317] Durch MD-Simulationen konnten experimentelle Eigenschaften dieser Strukturen, wie das Denaturieren einer α -Helix aus Polyalanine bei erhöhter Temperatur, visuell anschaulich nachgestellt werden.^[318] In diesem konkreten Beispiel konnte zudem die Ungenauigkeit bei Simulationen *in vacuo* gezeigt werden, da die α -Helix ohne Berücksichtigung des Lösungsmittels, eine deutlich höhere Stabilität besitzt, als physikalisch sinnvoll.^[318] Zwar sind Simulation in wässriger Umgebung mittlerweile Standard, da sie eine genauere Beschreibung von biologischen Makromolekülen erlauben, jedoch ermöglichen Simulationen *in vacuo* das schnelle Austesten von neuen Hypothesen durch wiederholte Simulationen, selbst bei größeren Systemen.^[319] Die Darstellung von biomolekularen Systemen auf atomarer Ebene hat jedoch seine Grenzen und selbst leistungsfähige Rechencluster, sind bei der Anwendung von großen Proteinsystemen auf ca. zwei Millionen Atome begrenzt.^[320] Um es dennoch zu ermöglichen, diese Systeme in einer adäquaten Weise darstellen zu können, müssen Vereinfachungen getroffen werden, wie z.B. die Anzahl an Interaktionszentren zu reduzieren. Eine beliebte Methodik sind *coarse-grain*-Modelle, die mehrere Atome zu einem Zentrum zusammenfassen und dadurch die Anzahl der Partikel drastisch reduzieren.^[321] Durch diese Vereinfachung war WARSHAW *et al.*, trotz starker Limitation der Rechenressourcen, in der Lage, Proteinfaltungen zu studieren.^[321] Während in den frühen Jahren auf Grund der Komplexität nur „Experten“ befähigt waren, diese Simulationen durchzuführen, zeigt ein Blick auf die Liste der Publikationen, dass in den letzten Jahren zunehmend auch hauptsächlich experimentell aufgestellte Arbeitsgruppen MD-Simulationen zu schätzen lernen.^[322] Zu dieser Entwicklung trägt auch die steigende Verfügbarkeit von leistungsfähiger Hardware zur Simulation von immer größeren Systemen bei (Abbildung 19).^[323] Während eine Zeitlang Supercomputer oder Rechencluster für die Berechnung von mittelgroßen Systemen notwendig waren, reicht aktuell für viele Applikationen ein starker Heimrechner aus.^[324,325] Entgegen dieses Trends entwickelten 2008 SHAW *et al.* einen Supercomputer mit dem Namen *Anton*, dessen Komponenten speziell auf die anspruchsvollen Kommunikationsabläufe der MD-Simulation ausgerichtet waren.^[326] Hierdurch gelang es, die strukturelle Dynamik des menschlichen Proteins Ubiquitin in einer Zeitskala von Piko- bis Millisekunden zu simulieren und verschiedene Mikrozustände zu identifizieren, die auch in Kristallstrukturen im Komplex mit unterschiedlichen Proteinen vorkommen.^[327] Da durch die globale Verbreitung von Heimcomputern die weltweite Rechenpower exorbitant gestiegen ist, entwarfen PANDE *et al.* eine Plattform namens *fold@home*, in der jeder Nutzer einen Teil seiner persönlichen Ressourcen zur Verfügung stellen konnte.^[328] Die Corona-Pandemie im Jahr 2020 motivierte eine Vielzahl an Hardwareenthusiasten, ihre

Rechenkraft *fold@home* zur Verfügung zu stellen, was dazu führte, dass dieses heterogene Computernetzwerk leistungsfähiger ist, als die schnellsten sieben Supercomputer zusammen.^[329] Neben Entwicklung auf Hardwareebene, machte auch die softwareseitige Forschung große Fortschritte, was zu einer Fülle an Programmen (GROMACS, AMBER, NAMD, CHARMM) führt, die für MD-Simulationen konzipiert wurden.^[330-334]

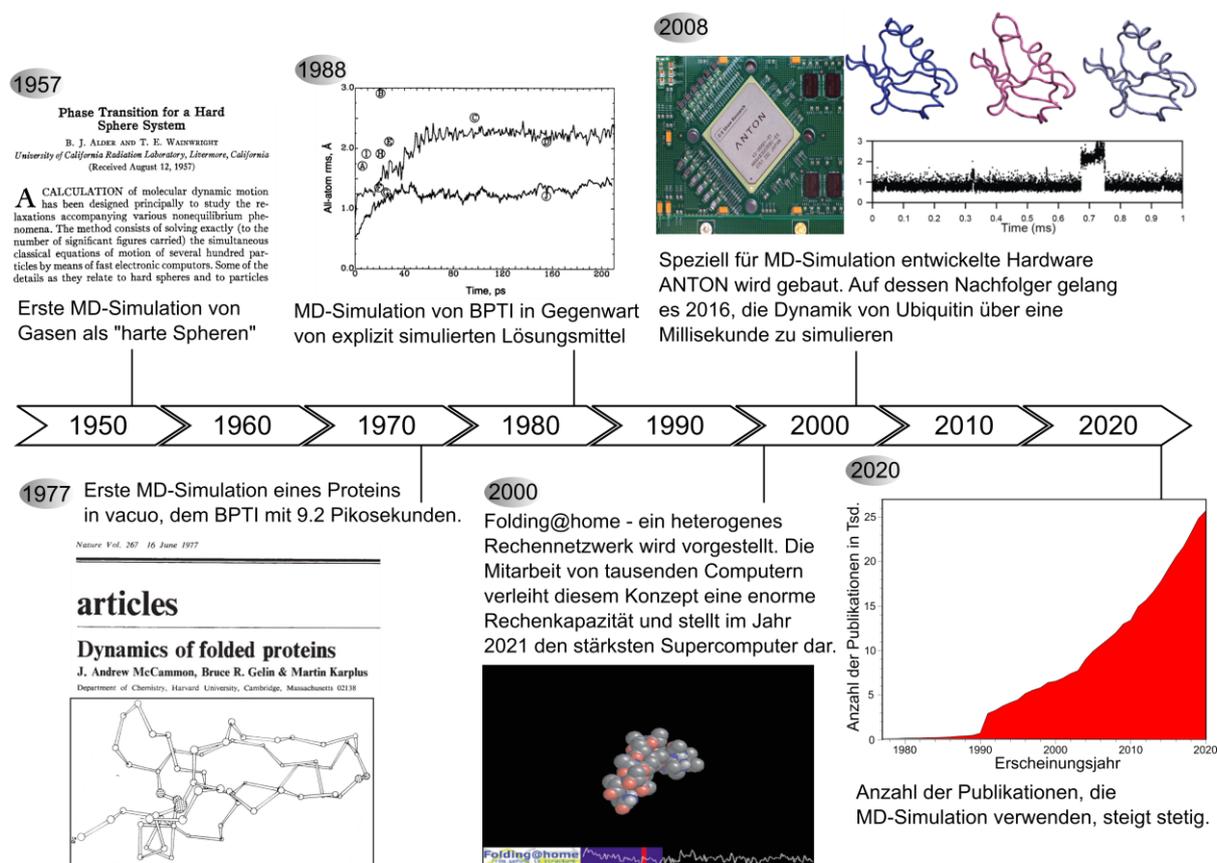


Abbildung 19: Zeitliche Einordnung bedeutsamer Meilensteine im Bereich der Moleküldynamik-Simulationen, die 1957 durch die erste MD-Simulation von Gasen ihren Anfang nahm.^[314] Zwanzig Jahre später gelang es, die Formalismen auf Proteine zu übertragen, wodurch eine 9.2 Pikosekunden-Simulation des BPTI ermöglicht wurde.^[315] Die Limitation, dass die Simulation nur im Vakuum in diesem Zeitrahmen möglich war, wurde maßgeblich die mangelnde Hardwareressourcen bestimmt. Bereits 1988^[316] konnte die Simulation erneut mit explizitem Berechnen von Lösungsmittelleffekten wiederholt werden. Während Kraftfelder und Softwarealgorithmen in den darauffolgenden Jahren stetig verbessert wurden, sollen zwei Meilensteine im Bereich der Hardwareentwicklung hervorgehoben werden. Ende 2000, stellten PANDE *et al.*^[328] eine Plattform bereit, um die Rechenleistung von Computer aus allen Teilen der Welt miteinander zu vernetzen. Diese heterogene Computernetzwerk stand seitdem den üblichen Supercomputerclustern in Nichts nach. Angetrieben durch die Einschränkungen der Coronapandemie 2020 stellten eine Großzahl von Computerbenutzern ihre Rechenleistung der *fold@home*-Plattform zur Verfügung, wodurch dieses Netzwerk so leistungstark war, wie die Kombination der sieben besten Supercomputer zusammen. Entgegen dieses Trends entwickelten SHAW *et al.*^[326] mit ANTON spezialisierte Hardware, die für MD-Simulationen optimiert war. Durch die Rechenleistung des Nachfolgers (ANTON2) konnte im Jahr 2016^[327] der Millisekunden Bereich für die Simulation von Ubiquitin erstmals erschlossen werden. Die Bedeutung von MD-Simulationen lässt sich auch in der nahezu exponentiell ansteigenden Anzahl an Publikationen ablesen, die diese Methode für die Untersuchung unterschiedlichster Systeme enthalten. Als Basis für die Erstellung des Graphen diente die Datenbank „*Web of Science*“ mit dem Schlüsselwort MD-Simulation, Stand 15.02.2021.

Ein weiterer Vorteil von MD-Simulationen liegt darin, dass sämtliche Bedingungen der Simulation sehr genau kontrolliert werden können. Angefangen von Temperatur und Salzgehalt bis hin zum

Primärsequenzaufbau des Peptids, Post-translationalen Modifikationen und Protonierungsgrad von Seitenketten sind alles Parameter, die beachtet werden müssen, um eine effektive MD-Simulation durchzuführen.^[306] Die Zusammensetzung des Lösungsmittels spielt eine elementare Rolle bei der korrekten Betrachtung von biologischen Makromolekülen, weshalb das explizite Simulieren von Lösungsmitteln bereits früh an Bedeutung gewonnen hat.^[316-335] Deswegen begann zeitnah die Entwicklung von Modellen, die das Verhalten von Wasser korrekt wiedergeben sollten. Ein guter Kompromiss aus Performance und Genauigkeit entwickelten JORGENSEN *et al.* mit dem TIP3P-Modell, einem Drei-Zentren-System, in dem jeweils eine partiell positive Ladung an den Wasserstoffatomen und eine partiell negative Ladung am Sauerstoffatom lokalisiert ist.^[336] Der Nachteil dieses Modells ist die Vernachlässigung der freien Elektronenpaare des Sauerstoffs, die im Nachfolgermodell TIP4P bzw. TIP5P eingefügt wurden, was zeitgleich jedoch höhere Rechenressourcen bedingt.^[337]

1.6.2 Kraftfelder – Rahmenbedingung zur Beschreibung von atomaren Interaktionen

Die interatomaren Wechselwirkungen in einer MD-Simulation werden durch ein Kraftfeld beschrieben, das aus einer begrenzten Anzahl von, meist empirisch hergeleiteten, Energiefunktionen besteht.^[338] Zunächst erfolgt die Kategorisierung der Simulation, da *coarse-grained*-Modelle andere Kraftfelder als *all-atom*-Betrachtungsweisen erfordern. Die Energiefunktionen beziehungsweise deren Variablen beinhalten die komplette Beschreibung des untersuchten Systems und können in bindende und nichtbindende Anteile kategorisiert werden.^[339] Zwar gibt es zahlreiche Kraftfelder, die jeweils einem eigenem Parametrisierungsprinzip unterliegen, jedoch existieren fünf Energierterme, die eine hohe Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Kraftfeldfamilien besitzen. Der Energieterm für bindende Wechselwirkungen besteht aus drei eigenständigen Termen für Bindungslänge, Bindungswinkel und Torsionen. Nicht-bindende Interaktionen werden häufig durch VAN DER WAALS^[340] und elektrostatische Wechselwirkungen (COULOMB) beschrieben.^[341]

$$E_{Konf} = E_{BL} + E_{BW} + E_{Torsion} + E_{NB} \quad (2)$$

$$E_{BL} = \sum_{\text{Bindungslänge } l} K_l (l - l_{eq})^2 \quad (3)$$

$$E_{BW} = \sum_{\text{Bindungswinkel } \theta} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \quad (4)$$

$$E_{Torsion} = \sum_{\text{Torsionswinkel } \varphi} K_\varphi [1 + \cos(n\varphi - \gamma)] \quad (5)$$

$$E_{NB} = \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{332q_i q_j}{er_{ij}} \right] \quad (6)$$

Gleichung 2-6: Die Gesamtenergie der Konformation eines Peptids (E_{konf}) setzt sich zusammen aus der Summe der Energien der Bindungslänge (E_{BL}), Bindungswinkel (E_{BW}), Torsionswinkel ($E_{Torsion}$) und nicht-bindenden Wechselwirkungen (E_{NB}). Diese können in einzelne Gleichungen aufgeteilt werden, wobei Bindungsschwingung und Winkeländerung durch eine harmonische Gleichung mit den jeweiligen Kraftkonstanten K_l und K_θ sowie den Gleichgewichtspositionen l_{eq} und θ_{eq} beschrieben werden. Die Torsionsenergie wird durch eine FOURIER-Serie charakterisiert, die eine Summe über alle Torsionen φ annimmt. Hierbei gibt n die Anzahl der Schwingungen, γ

die Phase und K_ϕ den Fourierkoeffizienten an. Der Nichtbindenden Wechselwirkungen-term setzt sich aus Lennard-Jones-Parametern und Coulomb-Interaktionen zwischen den Atompaares i und j , die durch eine Distanz r_{ij} getrennt sind, zusammen. A_{ij} und B_{ij} sind Koeffizienten des Lennard-Jones-Terms, während q_i und q_j Partialladungen darstellen. Die Dielektrizitätskonstante ϵ beträgt im Vakuum 1. Der Faktor 332 wurde eingeführt, um die Energie in kcal/mol ausdrücken zu können.

Neben dieser rein mathematischen Betrachtung der Energiefunktionen in einem Kraftfeld, soll weiterhin eine grafische Darstellung dieser Terme erfolgen (Abbildung 20).

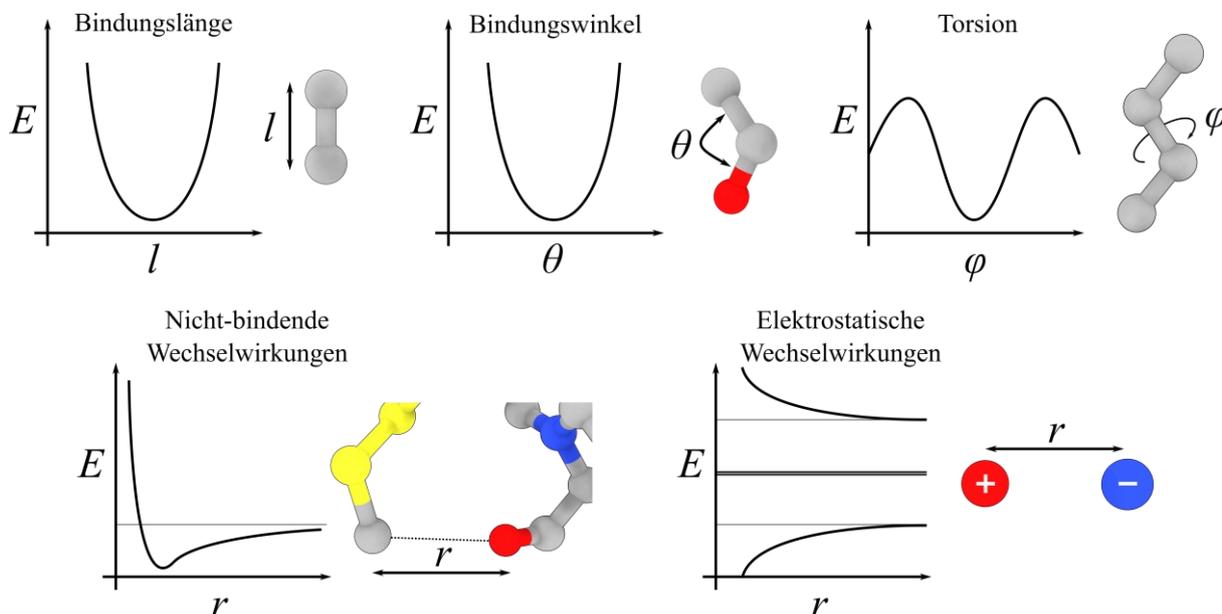


Abbildung 20: Darstellung der wichtigsten Kraftfeldenergieterme, die auch LEVITT in seiner Nobelpreislesung (2013) verwendet und die das Verhalten des betrachteten Systems in Moleküldynamik-Simulationen beschreiben. Sowohl Bindungslänge (l) als auch Bindungswinkel (θ) können durch einfache harmonische Potenziale dargestellt werden. Die Energiefläche von Torsionswinkeln wird in den gängigen Kraftfeldern häufig als Sinus- oder Cosinus-Funktionen abgebildet, die abhängig von der Art und Anzahl der benachbarten Atome, einen mehr oder minder komplexen Aufbau benötigen. Die Berechnung der nicht-bindenden Wechselwirkungen erfolgt durch das Lennard-Jones-Potenzial, während elektrostatische Interaktionen durch Coulomb-artige Gleichungen reguliert werden.

Die Generierung dieser Parameter erfolgt anhand experimenteller Studien von kleinen Molekülen, die durch theoretische Methoden, also quantenchemischen Berechnungen von kleinen Peptiden, wie dem Alanin-Dipeptid, ergänzt werden.^[339] Während Bindungslänge und Bindungswinkel mit vergleichsweise geringem Aufwand berechnet werden können, sind Torsionsparameter für Proteinfaltungssimulationen zur natürlichen Tertiärstruktur die wichtigste Energiekomponente.^[342-344] Die ersten Generation der bekanntesten Kraftfelder basierten häufig zu einem großen Anteil auf experimentelle Daten, die mit spektroskopischen Methoden (IR, UV/VIS, NMR etc.) bestimmt wurden.^[345] Mit jeder Iteration erhöhte sich der Anteil an Parametern, die durch immer präzisere quantenmechanische Berechnungen optimiert werden. Die aktuellen Vertreter der bekanntesten Kraftfeldfamilien für biologische Makromoleküle sind Charmm36,^[346] Amberffsb19,^[347] OPLS-AA/M,^[348] und Gromos54A7.^[349] Die Wahl des passenden Kraftfelds ist nicht trivial und hat einen erheblichen Einfluss auf das Ergebnis der Simulation, wie SHAW *et al.* in einer Vergleichsstudie zu sowohl stabilen Mini-proteinen, als auch intrinsisch ungeordneten Protein, zeigen konnten.^[350] Der

Vergleich mehrerer Kraftfelder aus verschiedenen Familien bei Stabilitätssimulationen enthüllte unterschiedliche Bevorzugungen für Sekundärstrukturelemente der jeweiligen Kraftfelder. Sehr markant ist dieser Unterschied bei der Betrachtung von intrinsisch ungeordneten Peptiden. Während Amber99SB-ILDN einen breiteren Bereich des konformationellen Raums abdeckte, als von experimentellen Studien angegeben, war Charmm36 eingeschränkter und stimmte mit NMR-Studien überein.^[350] Die einseitige Betrachtung eines biomolekularen Systems kann vermieden werden, indem kurze Testsimulationen mit mehreren Kraftfeldern durchgeführt und die Parameter, wie Sekundärstrukturanteil, RMSD, RMSF miteinander verglichen werden. Zusätzlich kann auf eine Vielzahl an durchgeführten MD-Simulationsstudien in der Literatur zurückgegriffen werden, wodurch etwaige Fehler minimiert werden.^[351]

1.6.3 Verfügbare Zeitskalen in klassischen MD-Simulationen

Wurde das entsprechende System aufgebaut, solvatisiert und das passende Kraftfeld ausgesucht, erfolgt nun die Berechnung der Kraft, die auf die Atome wirkt. Um numerisch unrealistische Ergebnisse zu vermeiden, wird die Bewegungsgleichung nach NEWTON^[308] jeweils nach einem bestimmten Zeitschritt integriert.^[322] Dieser Wert ist an die schnellsten Bewegungen innerhalb des System gekoppelt und beträgt standardmäßig bei *all-atom*-Simulationen von Proteinen 1-2 Femtosekunden.^[352] Dies hat zur Folge, dass bei der Simulation einer Proteinfaltung, selbst für schnellfaltende Proteine, im Mikrosekunden bis Millisekunden Bereich 10^9 beziehungsweise 10^{12} Rechenoperationen benötigt werden.^[352] Des Weiteren, kann es erforderlich sein, Simulationen zu wiederholen, um statistisch relevante Aussagen über das konformationelle Verhalten eines Proteins zu gewinnen.^[353] Ein weiterer Nachteil von klassischen MD-Simulationen liegt in der unzureichenden Fähigkeit, Energiebarrieren konsequent zu überschreiten.^[354] Bei der Suche nach der Grundzustands-Konformation stellt dies im Idealfall zwar kein Problem dar, jedoch nehmen energetisch ungünstige strukturelle Anordnungen bei Peptiden und Proteinen wichtige biologische Funktionen ein.^[355] So besitzen manche Enzyme in ihrer stabilsten Konformation eine geschlossene Bindungstasche, die jedoch für die erfolgreiche Katalyse den entsprechenden Liganden binden muss. Das Öffnen der Bindungstasche ist ein Prozess, der sich nur über Umwege durch klassische MD-Simulationen statistisch relevant darstellen lässt, wie BROKAW *et al.* am Beispiel der Adenylatkinase zeigen konnten.^[356] Die Kombination dieser Herausforderungen, biologisch relevante Prozesse im Mikrosekunden bis Millisekunden Bereich und unzureichendes *sampling* aufgrund des MD-Formalismus, motivierte verschiedene Arbeitsgruppen, Methoden zu entwickeln, um ein effektives Erkunden der Energiehyperfläche ressourcenschonend zu erlauben.^[357-360] Im folgenden Kapitel sollen Lösungsansätze dieser Problematik detaillierter beschrieben werden.

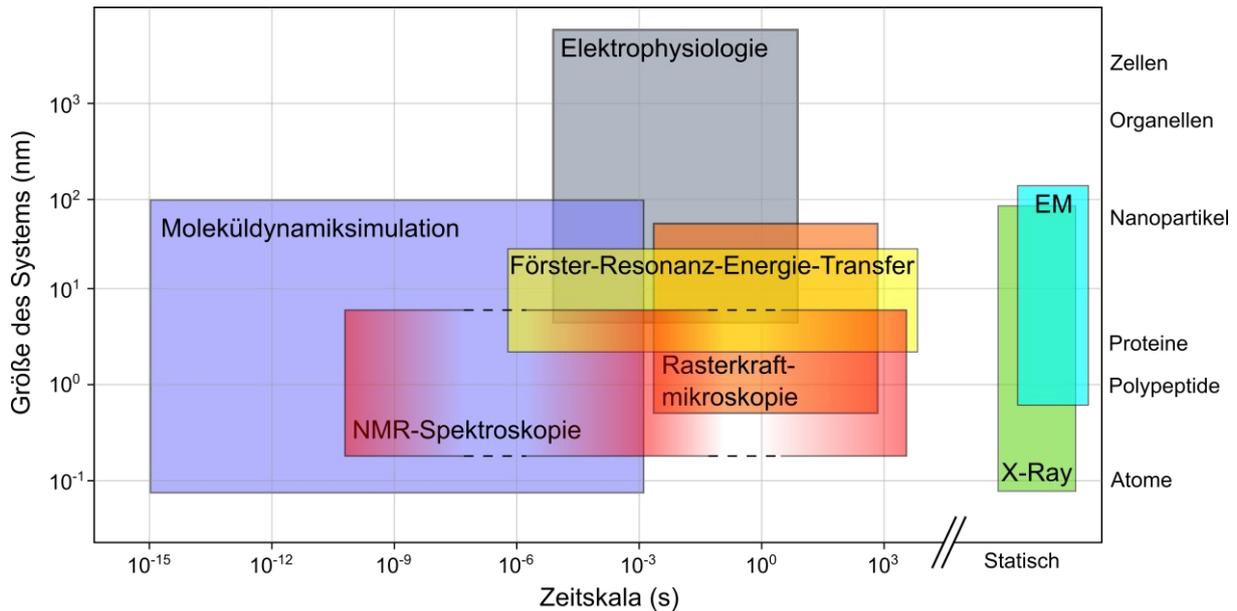


Abbildung 21: Einordnung verschiedener biophysikalischer Messmethoden im Vergleich zur Moleküldynamik-Simulationen, bezüglich ihrer zeitlichen und räumlichen Auflösungsmöglichkeiten, adaptiert von DROR *et al.*^[361] Während sowohl Elektronenmikroskopie (EM) als auch Kristallografie (X-Ray) nur in der Lage sind, statische Abbildungen des untersuchten Systems abzubilden, zeigen die restlichen dargestellten Messmethoden eine breite Zeitauflösungsspanne. NMR-Spektroskopie besitzt die größte zeitliche Auflösung, enthält jedoch, dargestellt durch die gestrichelten Linien, auch ungenaue Bereiche. MD-Simulationen ist eine rein-theoretische Methode, die jedoch durch Anpassung der Parameter an experimentelle Daten, eine gute Vorhersagbarkeit in bestimmten Systemen erreichen kann. Die Stärke der MD-Simulation liegt in ihrer großen Auflösung, sowohl im Bereich der Größe des Systems als auch in der zeitlichen Betrachtung.

1.7 Spezielle Techniken einer MD-Simulation

1.7.1 Enhanced Sampling Methoden

Schon die Begründer des MD-Formalismus für die Simulation von biologischen Makromolekülen erkannten die Limitationen ihrer Methode, Energiebarrieren zuverlässig zu überwinden. Während der Berechnung von Faltungsvorgängen verharrten teilgefaltete Strukturen in lokalen Energieminima und waren nicht in der Lage, während der Simulationszeit diese zu verlassen.^[362] Da die Energieverteilung des Systems direkt abhängig von der Temperatur ist, waren erste Lösungsansätze eine entsprechende Erhöhung, was zwar in einigen Fällen zu erfolgreichen Simulationen führte, jedoch den großen Nachteil mit sich brachte, dass ab einer bestimmten Temperatur auch Entfaltungsprozesse der Tertiärstruktur einsetzten.^[363,364] Als Alternative etablierten sich im Laufe der Jahre zahlreiche *enhanced-sampling* Methoden, die in zwei Kategorien *biased* beziehungsweise *unbiased*, zu Deutsch befangen oder unbefangen, eingeteilt werden können. Prominente Vertreter der ersten Kategorie sind gesteuerte Molekulardynamiksimulation (*steered MD*),^[357,365] beschleunigte MD (*accelerated MD*)^[358] und Metadynamik,^[360] während der zweiten Rubrik Replica-Exchange-Molekulardynamiksimulation (REMD)^[359] als ein dominanter Vertreter angehört. Da Metadynamik als Methode der Wahl für Fragestellungen innerhalb dieser Arbeit gewählt wurde, soll eine Zusammenfassung dieser Technik erfolgen.

1.7.2 Metadynamik – präzise Manipulation von einzelnen Parametern

Sämtliche benannte Methoden im vorherigen Kapitel besitzen als Ziel die adäquate Simulation von seltenen Ereignissen wie Proteinfaltungen, Protein-Protein-Wechselwirkungen, molekulare Erkennung, aber auch klassisch chemische Reaktionen sind Teil dieser Prozesse. PARRINELLO *et al.* entwickelten 2002 eine Methodik, um diese seltenen Events gezielt zu simulieren, ohne gleichzeitig einen großen Bedarf an Computerressourcen zu generieren.^[360] In dieser Methode, auch Metadynamik genannt, werden zunächst ein, oder mehrere Parameter beziehungsweise Reaktionskoordinaten vor der Simulation ausgewählt, die den betrachteten Prozess möglichst genau beschreiben. Die Autoren wählten für die methodische Demonstration die Dissoziation von Natriumchlorid in Lösung. Als Parameter, die in der Metadynamik kollektive Variable, im Englischen *collective variable* (CV) bezeichnet werden, wurde die Distanz zwischen dem Natriumion und dem Chlorid definiert.^[360] Gemäß der Metadynamik, werden während der Simulation Gaußpotenziale auf bereits simulierte Zustände der Reaktionskoordinate abgelegt. Hierdurch wird das System entmutigt, diesen Bereich der kollektiven Variablen erneut abzudecken und im Gegenzug gedrängt, noch nicht simulierte Regionen zu erkunden.^[360] Der Algorithmus basiert auf einer Dimensionsverringern und wurde erstmalig von KEVREKIDIS *et al.* postuliert.^[366,367] Um diese Vorstellung zu vereinfachen, wird häufig eine qualitative und makroskopische Beschreibung von Metadynamik vorgenommen. Auf der Basis der anschaulichen Zusammenfassung von LAZIM *et al.*^[368] soll nun ebenfalls ein makroskopisches Abbild der Metadynamik gezeichnet werden. Man nehme an, ein Sportler fällt, während seiner nächtlichen Laufrunde durch den Wald in eine zuvor unbekannte Baugrube. Da die Wände dieser Grube zu steil sind, besitzt der Läufer keine Möglichkeit, direkt der Grube zu entkommen. Dies entspricht einer Energiebarriere, z.B. der Dissoziation von Natriumchlorid, die in einer klassischen MD-Simulation nicht oder nur unzureichend überwunden werden kann.^[369] Der Sportler bewegt sich also in der Grube ohne einen definierten Pfad umher und wird, dadurch dass es dunkel ist, mit einer hohen Wahrscheinlichkeit tiefer in die Grube hineingehen und nur in Ausnahmefällen in der Lage sein, höher gelegene, für ihn erreichbare Stellen (Sattelpunkte auf der Energiefläche) zu finden. Dieser *random walker* wird mit hoher Wahrscheinlichkeit die Grube niemals verlassen, sondern nach gegebener Zeit den tiefsten Punkt der Senke erreichen.^[368] Dieses Abbild ist das makroskopische Pendant zur klassischen MD-Simulation eines biologischen Prozesses, die mit nur einer geringen Wahrscheinlichkeit Übergangszustände abdecken kann. In einer Metadynamiksimulation besitzt der Läufer einen unendlich großen Beutel, der mit Sand gefüllt ist und ein Loch hat.^[368] Nach jedem Schritt, den der Läufer tätigt, verliert der Beutel ein wenig Sand an der entsprechenden Position, was dazu führt, dass sich die Grube langsam zu füllen beginnt. Auch hier wird der Sportler zunächst die tiefen Regionen der Furche erkunden, jedoch Stück für Stück wird es ihm erleichtert, neue Regionen, wie z.B. Übergangszustände zu erreichen (Abbildung 22).^[368] Nach einer gewissen Zeit ist die Grube komplett mit Sand gefüllt. Diese nahezu ebene Fläche erlaubt es dem Sportler nun, die Grube vollständig zu verlassen. Die große Errungenschaft in der Metadynamik ist, dass der Läufer sich „erinnert“, welche Regionen er bereits erkundet und mit Sand

gefüllt hat.^[368] Daraus kann später ein Spiegelbild der Grubenlandschaft (die freie Energiefläche) erstellt werden.

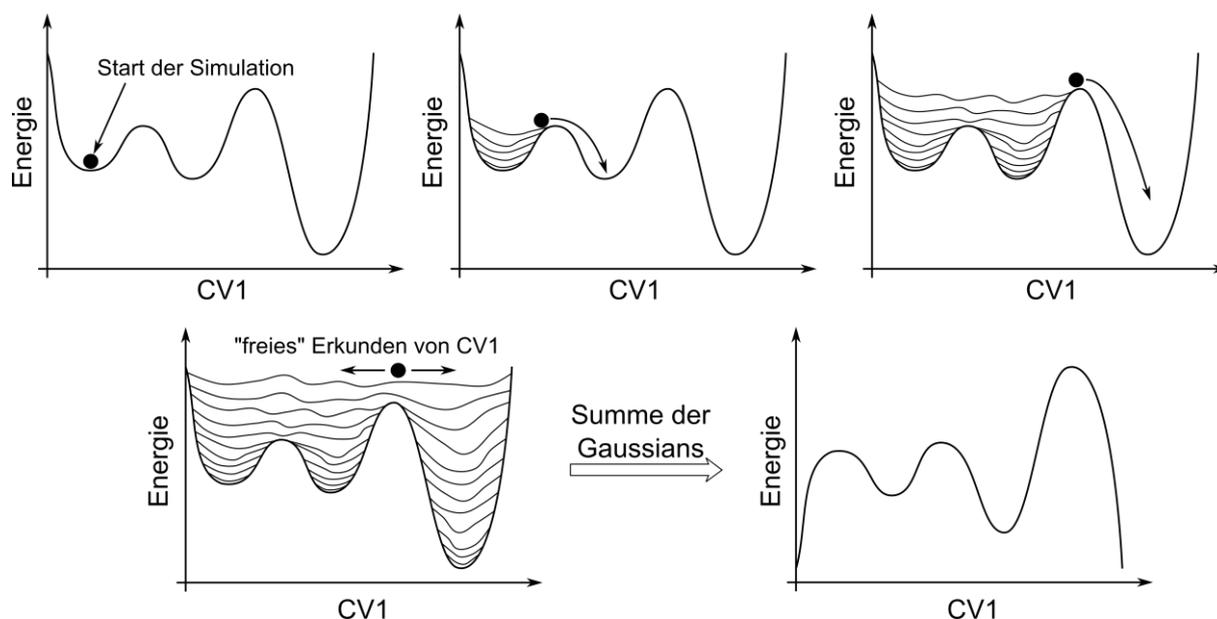


Abbildung 22: Mögliche Entwicklung der Energiefläche während einer Metadynamik-Simulation. Zunächst befindet sich das System, symbolisiert durch den schwarzen Punkt in einem lokalen Minimum, wobei CV1 eine beliebige kollektive Variable ist, die vor der Metadynamik identifiziert wurde. Nach einem bestimmten Zeitschritt wird jedes Mal ein Gaussianpotenzial an Position des Systems abgelegt, wodurch sich das lokale Minimum langsam auffüllt. Dies ermöglicht es, das benachbarte Minimum zu erkunden, wodurch auch dieses nach einer gewissen Simulationszeit sich langsam auffüllt. Dieser Prozess kann wiederholt werden, sodass auch ein globales Minimum entdeckt werden kann. Die Metadynamik gilt als konvergiert, wenn ein freies Erkunden von CV1 möglich ist, da sämtliche Minima aufgefüllt wurden. Anschließend kann die freie Energiefläche aus der Summe der Gaussianpotenziale errechnet werden.

1.7.3 Die Qual der Wahl von kollektiven Variablen

Der Erfolg einer Metadynamik ist intensiv verwoben mit der korrekten Auswahl der kollektiven Variablen, was kein triviales Unterfangen darstellt. Eine unzureichende Identifikation von kollektiven Variablen führt mindestens zu einer längeren Simulationszeit und im schlimmsten Fall zu einer unrealistischen Energiefläche, die falsche Schlussfolgerungen des betrachteten Systems zulässt. Sowohl PARRINELLO *et al.* als auch weitere Arbeitsgruppen formulierten deshalb fundamentale Kriterien und Methoden, die bei der Auswahl der kollektiven Variablen assistieren sollen.^[370-373] Eine grundlegende Anforderung an die Parametern ist, Anfangs- und Endzustand adäquat zu beschreiben. Bei der im Kapitel 1.7.2 untersuchten Dissoziation von Natriumchlorid, ist der Abstand zwischen den Ionen ein einfacher aber aussagekräftiger Parameter.^[360] Zusätzlich sollten alle langsamen Bewegungen, die beim betrachteten Prozess eine Rolle spielen, zusätzlich als kollektive Variable aufgenommen werden, da ansonsten die Energiefläche eine falsche Topografie annimmt und die Simulation nicht oder nur sehr langsam konvergiert.^[368] Ein anschauliches Beispiel dieses Problems zeigten BRANDUARDI *et al.* bei der Dissoziation von Tetramethylammonium aus der Bindungstasche von Acetylcholinesterase (AChE).^[374] Ursprünglich erfolgte die Selektion des offensichtlichen Parameters, die Distanz zwischen

Tetramethylammonium und dem Zentrum der Bindungstasche, was jedoch zu keiner Konvergenz der freien Energiefläche führte.^[374] Als Ursache ließ sich ein benachbartes Tyrosin identifizieren, das den Ausgang für Tetramethylammonium blockierte und so eine gleichmäßige Konvergenz verhinderte. Nachdem das Öffnen dieser Versperrung als zweite kollektive Variable hinzugefügt wurde, konnte die Metadynamik erfolgreich abgeschlossen werden.^[374] Als letzte Richtlinie soll erwähnt werden, dass nur die benötigte Anzahl an kollektiven Variablen für die Beschreibung des untersuchten Prozesses ausgewählt werden sollte, da jeder zusätzliche Parameter die Berechnungskosten ansteigen lässt und ab einer gewissen Anzahl (ca. ab fünf CVs) die Simulationszeit für eine geeignete Konvergenz der Energiefläche außerhalb der Durchführbarkeit liegt.^[375] Jedoch gibt es, wie bei jeder Methode, Limitationen ihrer Anwendbarkeit. Die Faltungsstudie eines 20mer β -hairpin Peptids zeigte, dass keine Kombination an kollektiven Variablen ausreichte, um die Energiefläche des Faltungsprozesses korrekt wiederzugeben (Abbildung 23).^[376] Erst die Kombination aus Metadynamik und REMD,^[359] einer weiteren *enhanced sampling* Methode, führte zum gewünschten Ergebnis.^[376]

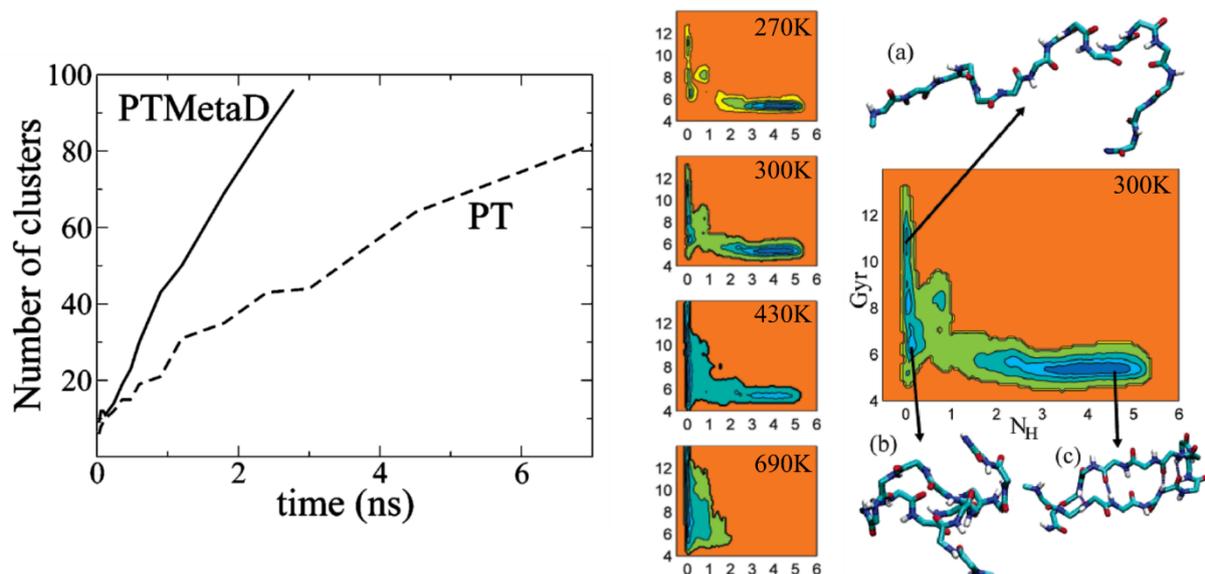


Abbildung 23: Limitation der Metadynamik, demonstriert durch das zweidimensionale Faltungsprofil eines β -hairpin Peptids. Links: Anzahl der Cluster, die während der Simulation von PARRINELLO *et al.* generiert wurden.^[376] Zunächst wurde die Simulation mit dem *parallel-tempering*-Formalismus^[359] modifiziert, was jedoch nur zu einer geringeren Anzahl an erkundeten Clustern führte. Eine Kombination beider Methode, die die Autoren PT-MetaD nannten ermöglichte es in kürzerer Simulationszeit eine Vielzahl an Clustern zu generieren. Rechts: Zweidimensionale Energiefläche, bei einer PTMetaD eines β -hairpin Peptids bei unterschiedlichen Temperaturen.^[376] Die Energiefläche bei 300 K enthält den am besten beschriebenen konformationellen Bereich, wobei als Parameter die Anzahl Wasserstoffbrückenbindungen und der Streumassenradius ausgewählt wurden. Erst durch die Auswahl dieser kollektiven Variablen, in Kombination mit dem *parallel-tempering*-Formalismus gelang es, in kurzer Simulationszeit die konformationellen Raum adäquat zu beschreiben.

Zuletzt soll die Erweiterung der gut-temperierten (*well-tempered*) Metadynamik, auch mit *wt*-MetaD abgekürzt, benannt werden. Zwar enthält die von PARRINELLO *et al.* vorgestellte Methode ein enormes Potenzial und führte zu zahlreichen theoretischen Untersuchungen, die die wissenschaftliche Gemeinschaft bereicherten,^[377-379] jedoch verlangt die Durchführung der Simulation eine gewisse Vorkenntnis, wann der untersuchte Prozess abgeschlossen ist. Durch den Metadynamik-Formalismus

wird nach einem definierten Zeitschritt ein Gaussianpotenzial im entsprechenden Zustand Minimum abgelegt, was zur Folge hat, dass nach einer bestimmten Zeit Energiebarrieren überschritten werden, die zu physikalisch unrealistischen Zuständen führen.^[380] Daher ist eine genaue Betrachtung des Simulationsverlaufs erforderlich, um diese gezielt abschließen zu können. Dieses Problem kann umgangen werden, wie BARDUCCI *et al.* mit dem *well-tempered* Formalismus demonstrierten.^[380] Der Vorteil dieser Methode liegt in dem geringeren Risiko, Energieminima zu überfüllen und damit-verbundenes Überschreiten in physikalisch unrealistische Regionen zu vermeiden. Weiterhin kann bereits durch die Durchführung einer einzigen Simulation die Konvergenz durch eine Blockanalyse abgeschätzt werden.^[373,381] Die genaue Anpassung der Höhe des Gaussians, erlaubt es dem System entweder, neue Bereiche zu erkunden, oder beieinander naheliegende Minima präziser zu beschreiben.^[380] Die Vorteile des *enhanced sampling* der Metadynamik können somit in Kombination mit der Beschränkung der Energiefläche auf einen physikalisch realistischen Bereich genutzt werden.^[380] Diese Kombination verleiht *well-tempered* Metadynamik einer großen Popularität im Bereich der Computer-gestützten Simulationen von komplexesten Systemen.^[382-386]

1.7.4 Hauptkomponentenanalyse

Proteindynamik kann als eine Veränderung der Konformation eines Polypeptids als Funktion der Zeit betrachtet werden.^[387] Diese Konformationsänderungen erstrecken sich über eine große zeitliche und räumliche Skala und können als einen mehrdimensionalen Vektorraum, der mit der Anzahl der Freiheitsgrade korreliert, dargestellt werden.^[387] Um gezielt Bewegungsänderungen, die für biologische Prozesse von essenzieller Bedeutung sind zu identifizieren, ist in eine simple Betrachtung der Trajektorie aus einer MD-Simulation, nur in den seltensten Fällen ausreichend. Dies ist der Gegebenheit geschuldigt, dass wichtige, häufig langsame Bewegungen von lokalen schnellen Fluktuationen überlagert werden. Ein Lösungsansatz bietet die von PEARSON formulierte Hauptkomponentenanalyse.^[388] Diese Methode war zunächst nur auf wenige Variablen anwendbar, wurde jedoch durch die Entwicklung von Computern stetig erweitert.^[389] Das Ziel einer Hauptkomponentenanalyse, im weiteren Text als PCA (engl. *principal component analysis*) abgekürzt, ist die Reduktion der Dimensionalität eines multivarianten Datensatzes. Hierbei wird eine Anzahl an zusammenhängenden Variablen p genommen (x_1, x_2, \dots, x_p) und durch eine Kombination, basierend auf der Varianz ein neuer Datensatz an Variablen (z_1, z_2, \dots, z_p) erzeugt.^[389] Im Fall der Analyse einer MD-Trajektorie erfolgt zunächst die Generierung der Kovarianz- oder Korrelationsmatrix ($p \times p$), die von der Anzahl (n) an Strukturzuständen, die simuliert wurden, abhängt. Eine PCA ist nur dann erfolgreich und aussagekräftig, wenn Variablen gewählt werden, die Änderungen innerhalb des Systems effektiv beschreiben können.^[389] Die kartesischen Koordinaten der α -Kohlenstoffatome eines Proteins wurden in einer Vielzahl von Studien ausgewählt und stellen ein effektives Variablen-set dar.^[390-392] Um Verunreinigungen der essenziellen Dynamik des Proteins zu vermeiden, erfolgt nun die Entfernung von

Rotation und Translation des Proteins, indem sämtliche Strukturen auf die gemittelte Konformation ausgerichtet werden.^[387] Anschließend können die korrelierten Bewegungen innerhalb eines Proteins mit N Atomen durch eine Kovarianzmatrix wie folgt beschrieben werden.

$$\sigma_{ij} = \langle (r_i - \langle r_i \rangle)(r_j - \langle r_j \rangle) \rangle \quad (7)$$

Gleichung 7: Erstellung der Kovarianzmatrix durch Massen-gewichtete kartesische Atomkoordinaten.

Die Variablen r_1, \dots, r_{3N} stellen die kartesischen Atomkoordinaten dar, die zusätzlich noch nach ihrer Masse gewichtet wurden, während $\langle \dots \rangle$ die Mittelung über alle simulierten Konformationen anzeigt.^[393] Durch eine Diagonalisierung dieser Matrix werden $3N$ Eigenvektoren (v^i) mit den dazugehörigen Eigenwerten erhalten.^[393] Diese sind nun in der Lage, verknüpfte Bewegungen in ihrer Richtung und Auslenkung zu beschreiben und bilden in Kombination mit der Projektion der Daten die Hauptkomponenten nach Gleichung 8.

$$V_i = v^i \cdot r \quad (8)$$

Gleichung 8: Erhalt von Hauptkomponenten (V_i) durch Projektion der Atoomkoordinaten auf den jeweiligen Eigenvektor.

Das Auftragen der Hauptkomponenten gegeneinander erlaubt es, eine Energiefläche des Proteins in Abhängigkeit der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Komponenten zu erstellen.^[393]

$$\Delta G(V_1, V_2) = -k_B T \ln P(V_1, V_2) \quad (9)$$

Gleichung 9: Durch das Auftragen der Wahrscheinlichkeitsverteilung der entsprechenden Hauptkomponenten in Abhängigkeit mit der Boltzmann-Konstante und der Temperatur kann eine zweidimensionale freie Energiefläche erhalten werden.

Nach einer erfolgreichen PCA muss nun bestimmt werden, wie viele reduzierte Dimensionen ausreichen, um die wichtigsten kollektiven Bewegungen zu beschreiben. Eine einfach durchführbare und dennoch qualitativ aussagekräftige Möglichkeit ist der *Scree-Test*, auch *Ellenbogenkriterium* genannt.^[394] In diesem Plot werden die Eigenwerte, die durch die Diagonalisierung der Kovarianzmatrix erhalten wurden, nach Größe geordnet und mit ihrem Betrag auf der y-Achse abgebildet.^[389] Zusätzlich erfolgt eine Skalierung der Eigenwerte, indem jeder Eigenwert durch die Summe aller Eigenwerte geteilt wird, was ein Abschätzen des prozentualen Anteils einzelner Eigenwerte erleichtert.^[389] Anschließend sollte der erhaltene Plot einen Knick, ähnlich dem eines gebeugten Ellenbogens, aufweisen, an dem die Varianz steil abfällt und zu einem relativ stabilem Wert konvergiert.^[389] Tritt dieser Knick nach den ersten Dimensionen mit großen Eigenwerten auf, so kann ein Großteil der Varianz des Systems in wenigen Dimensionen beschrieben werden.

Zwar bildet die Auswahl sämtlicher Atome eines Proteins in vielen Fällen eine ideale Gruppe an Variablen, um kollektiven Bewegungen zu isolieren, da eine Wichtung der Koordinaten nach Masse der Partikel erfolgt, dennoch gibt es Systeme, die eine Fokussierung der Variablengruppe erfordern, um eine geringe Anzahl an Dimensionen zu erhalten, wie EVANSECK *et al.* am Beispiel des Myoglobins

demonstrieren konnten (Abbildung 24).^[395] Die Autoren wählten zu Beginn ihrer PCA zunächst die kartesischen Koordinaten sämtliche Atome als Variablen, was zu einem Scree-Plot führte, der keinen erkennbaren Knick enthielt, wodurch weiterführende Analysen erschwert wurden.^[389,395] Erst die Verkleinerung der Variablenauswahl auf die α -Kohlenstoffatome und sämtliche Atome des zentralen His⁶⁴ führten zu einem *Scree-Plot* mit klar definierten Knick.

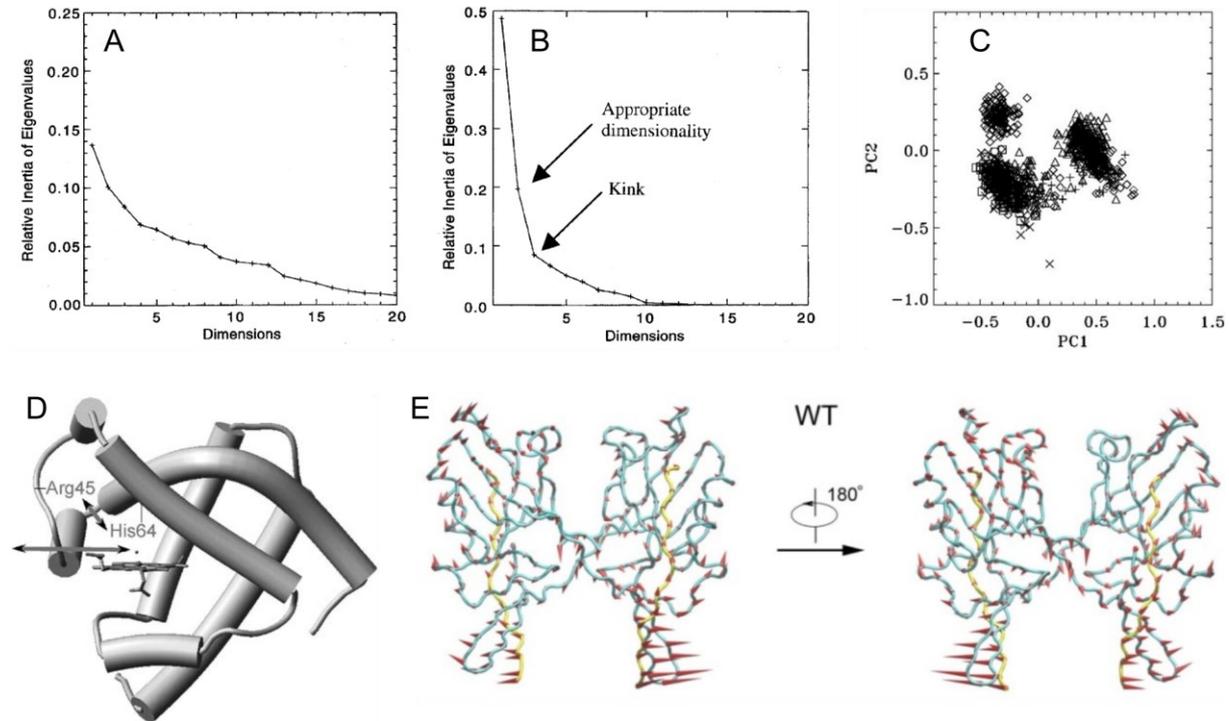


Abbildung 24: Links oben: Scree-Plot, adaptiert von EVANSECK *et al.*^[389] generiert durch eine PCA von der MD-Simulation des Myoglobins (D). Der Vergleich beider Graphen (A und B) zeigt, die Abwesenheit eines definierten Knicks, falls die Koordinaten sämtlicher Atome für die PCA berücksichtigt werden (A). Erst die Reduktion auf die α -Kohlenstoffatome in Kombination mit allen Atomen von His⁶⁴ führten zu einem gut ausgebildeten Knick im Scree-Plot (B). Die daraus generierten Hauptkomponenten (C) umspannen drei klar abgegrenzte Cluster, die in weiterer Analyse zusätzliche Informationen über die Energiefläche liefern können.^[389] Diagonalisierung der Kovarianzmatrix, die aus den Atomkoordinaten aufgebaut ist, liefert Eigenvektoren, die in der Lage sind, Bewegungen der Struktur, die für die größte Varianz im System verantwortlich sind, darzustellen, wie am Beispiel des Myoglobin von EVANSECK *et al.* gezeigt wurde.^[389,395] Diese Form der Analyse und Darstellungsweise wird auch essenzielle Dynamik bezeichnet und wurde von BERENDSEN *et al.*^[396] entwickelt und von zahlreichen Arbeitsgruppen routiniert auf komplexe Proteinsysteme angewandt, wie z.B: dem Synapse-assoziierten-Protein (E).^[397]

2. Aufgabenstellung

Die intrinsische Flexibilität, sowie die Bewegungen gesamter Strukturelementgruppen von biologischen Makromolekülen gelten als elementare Faktoren um Prozesse, in denen diese Systeme involviert sind, aufzuklären. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein systematisches Bild für die korrelierte Dynamik in unterschiedlichen Miniproteinsystemen entwickelt werden. Sowohl das Zinkfingerpeptid, als auch das von SCHRIMPF *et al.* designte dimere Tetradisulfid zeigten in NMR-spektroskopischen Studien interessante Beweglichkeitsmerkmale.^[227,275] Letzteres erfüllt zudem wichtige Kriterien bezüglich des Designs von Miniproteinen, da es nicht in der Natur vorkommt, dennoch aus einer kodierbaren Sequenz besteht und modular einsetzbar ist. Die Autoren konnten dieses Strukturmotiv als Dimerisierungsdomäne nutzen, wobei die jeweilige Aktivität der Proteinen (IgG Antikörper und LEH) erhalten blieb. Daher soll die Dynamik des dimeren Tetradisulfids sowohl isoliert als auch in Proteinumgebung unter dem Gesichtspunkt der Scharnier-artigen Bewegung betrachtet werden. Die Primärstruktur eines einzelnen Zinkfingers besteht aus maximal 30 Aminosäuren und enthält dennoch viele Sekundärstrukturelemente, die auch in größeren Proteinen zu finden sind. Die α -Helix und der β -*hairpin* sind um ein Zink-Ion und einem hydrophoben Kern, bestehend aus Leucin und Phenylalanin angeordnet, der trotz seiner dichten Packung eine gewisse Flexibilität aufzeigt. Da dieses Miniprotein über einen stark limitierten Temperaturbereich verfügt, sind klassische Methoden, die auf Erhitzen oder Abkühlen zur Charakterisierung von Bewegungen beruhen, ungeeignet. Daher sollte eine Methodik aufbauend auf synthetischen Modifikationen und computergestützten Simulationen entwickelt werden, um die Flexibilität des hydrophoben Kerns systematisch zu beschreiben. Im ^1H -NMR-Spektrum des zweiten Modellsystems, dem dimeren Tetradisulfid von SCHRIMPF *et al.*, konnte eine Verbreiterung der Signale durch konformationellen Austausch beobachtet werden, wobei postuliert wurde, dass dies auf eine scharnierartige Bewegung des Peptids zurückzuführen ist. Streuradienmessungen und zweidimensionale NMR-Spektroskopie lieferten nicht genügend Erkenntnisse, um diesen Bewegungsablauf vollumfänglich zu beschreiben. Ausgehend von diesen Fragestellungen sollten Moleküldynamik-Simulationen durchgeführt werden, um das dynamische Verhalten beider Systeme abzubilden. Die Ergebnisse der klassischen MD-Simulation sollten im Zinkfingerpeptid durch synthetische Modifikationen des hydrophoben Kerns ergänzt werden, wodurch nicht nur der sterische Anspruch verändert und damit auch Energiebarriere der Torsion beeinflusst wird, sondern auch Symmetrie aufgebrochen wird. Ausgehend von der NEGISHI-Kreuzkupplung, sollte eine Reihe von Toly-Aminosäuren synthetisiert werden, um den Einfluss von systematischen Methyl-Hüpfen auf den hydrophoben Kern zu charakterisieren. Neben einfachen einseitigen Substitutionen sollten asymmetrische doppelte Methylierungen evaluiert werden, wodurch der Einfluss einer einzelnen Methylgruppe durch Konkurrenz bestimmt werden kann. Um die Seitenkettendynamik von Phe¹³ im Zinkfingerpeptid durch Temperaturänderungen dennoch sichtbar zu machen, sollten symmetrische Substitutionsmuster entwickelt werden, die die Energiebarriere auf einen entsprechenden Bereich anheben. Etwaige Limitationen des Moleküldynamik-Formalismus, dem unzureichenden Vermögen,

systematisch Energiebarrieren zu überschreiten, sollten durch Methoden ausgeglichen werden, die auf der Reduktion der Dimensionalität beruhen. Da die *wt*-Metadynamik nicht nur die Möglichkeit besitzt, die Simulation in eine gewünschte Richtung zu beeinflussen, sondern auch Energieprofile zu erstellen, sollte diese auf die untersuchten Systeme angewandt werden, wobei sich zunächst die Notwendigkeit der Auswahl von kollektiven Variablen ergibt. Während die untersuchte Beweglichkeit im Zinkfinger auf die Rotation des aromatischen Rings (χ_2) innerhalb des hydrophoben Kerns reduziert werden kann, sind die grundlegenden Bewegungen des Scharnier-Peptids nicht aufgelöst. Ein Lösungsansatz bietet die Hauptkomponentenanalyse (PCA), die auf die Trajektorie der MD-Simulation angewandt werden sollte, um kollektive Variablen auszuwählen und in der Metadynamik zu beeinflussen. Neben diesen Miniproteinen sollte zudem die Seitenkettendynamik von natürlichen Aminosäuren, beziehungsweise β,β -Diaryl-Aminosäurehybriden aufgeklärt werden. NICKE *et al.*^[95] etablierten eine Synthesemethode, ausgehend von einer C-H-Aktivierung, mit der diese synthetischen Aminosäuren dargestellt werden konnten. Durch die Einbringung eines zweiten aromatischen Ringsystems, wurde die Beweglichkeit beider Gruppen stark eingeschränkt, wobei NMR-spektroskopische Untersuchungen Hinweise auf eine *gearing*-Bewegungen lieferten. Zur Charakterisierung dieser Dynamik sollten erneut MD-Simulationen und Metadynamiken entwickelt werden. Weiterhin sollten auf Basis von quantenchemischen Berechnungen Substitutionsmuster postuliert werden, die diese Bewegungsform gezielt hervorrufen könnten. Da die Aminosäurehybride bereits in biologische relevante Peptide eingebaut wurden und deren NMR-Charakterisierung Indizien auf ein seltenes Strukturmotiv aufzeigten, sollten NMR-Strukturensembles auf Basis von NOE-Kontakten erstellt werden. Die so erhaltenen Informationen über die korrelierte Dynamik könnten wichtige Erkenntnisse für das gezielte Design von weiteren Miniproteinen hervorbringen.

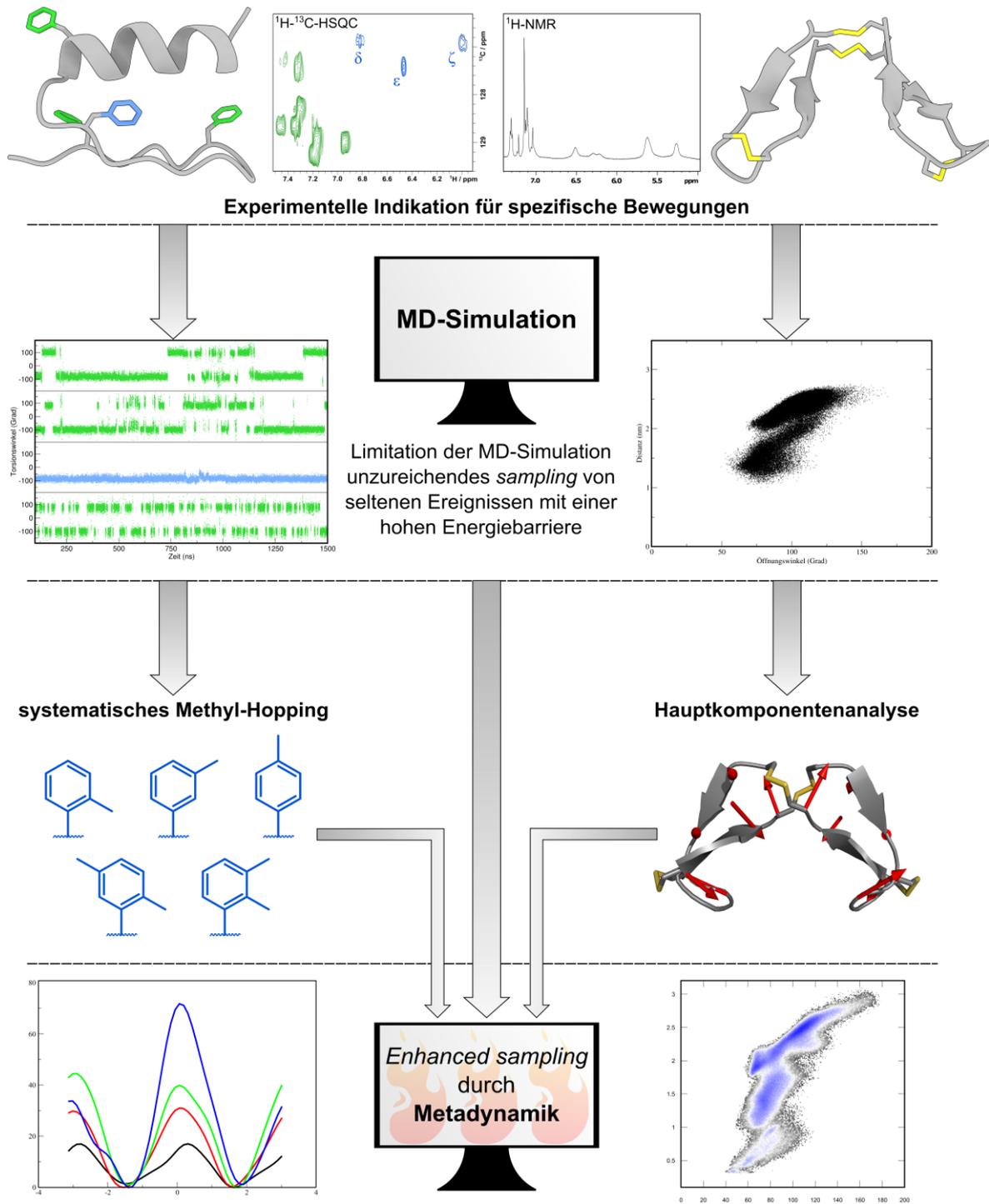


Abbildung 25: Aufgabenstellung, die im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet werden sollte. Es galt, die Dynamik von zwei Miniproteinen aufzuklären, die in experimentellen Studien spezifische Bewegungen aufwiesen (Abbildung 1). Während die Beweglichkeit des hydrophoben Kerns innerhalb des Zinkfingerpeptids auf die Rotation um χ_2 des zentralen Phenylalanins reduziert werden kann, ist der verfügbare konformationelle Raum des Scharnier-Peptids nicht entschlüsselt. Moleküldynamik-Simulation stellt eine ideale Methode da, um Beweglichkeiten auf atomarer Ebene zu darzustellen, scheitert jedoch am konsequenten Überqueren von Energiebarrieren. Metadynamik sollte in der Lage sein, das Energieprofil adäquat zu beschreiben. Hierfür werden jedoch kollektive Variablen benötigt, die beim Modell des Zinkfingers zwar bekannt, im Scharnier-Peptid jedoch im multidimensionalen konformationellen Raum überlagern sind. Hierfür sollte die Hauptkomponentenanalyse als Reduktionsmethode angewandt werden. Um eine detailliertere Betrachtung des hydrophoben Kerns zu erlauben, sollten unnatürliche TolyI-Aminosäuren durch systematischen Methyl-Hopping synthetisiert werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung der Dynamik eines dimeren Tetradisulfids - verdient es den Namen Scharnier-Peptid?

3.1.1 Generierung einer Startstruktur

Durch die Entdeckung und Charakterisierung eines spontan dimerisierenden Tetradisulfids, legten SCHRIMPF *et al.* im Jahr 2017 die synthetischen und analytischen Voraussetzungen für computer-gestützte Betrachtungen dieses Mini-proteins.^[275] Erwähnenswert ist dabei die Selektivität, mit dem dieses Strukturmotiv ausgebildet wird, da weder nennenswerte Mengen an Monomer, noch parallel-verknüpftes Dimer nachgewiesen werden konnten. NMR-spektroskopische Analysen zeigten eine Verbreiterung der Signale durch konformationellen Austausch. Die Autoren postulierten, dass dieses stark eingeschränkte Peptid eine scharnierartige Bewegung mit einer so großen Energiebarriere ausführen muss, dass ein schneller Austausch bei Raumtemperatur verhindert wird.^[275] Um dieses Phänomen detaillierter zu beschreiben, wurden unter anderen Strukturbilder erstellt, die von Streuradiusmessungen mittels Ionenmobilitätsspektrometrie bestätigt wurden. Die Auswertung der zweidimensionalen NOESY-Spektren enthüllten ein doppeltes antiparalleles β -*hairpin*-Motiv mit einer C_2 -Symmetrie.^[275] Neben Charakterisierung des isolierten Peptids, nutzten die Autoren das Strukturmotiv als Dimerisierungsdomäne von Proteinen, wobei gezeigt werden konnte, dass sowohl der IgG-Antikörper als auch das LEH-Protein in ihrer Aktivität nicht eingeschränkt werden.^[398]

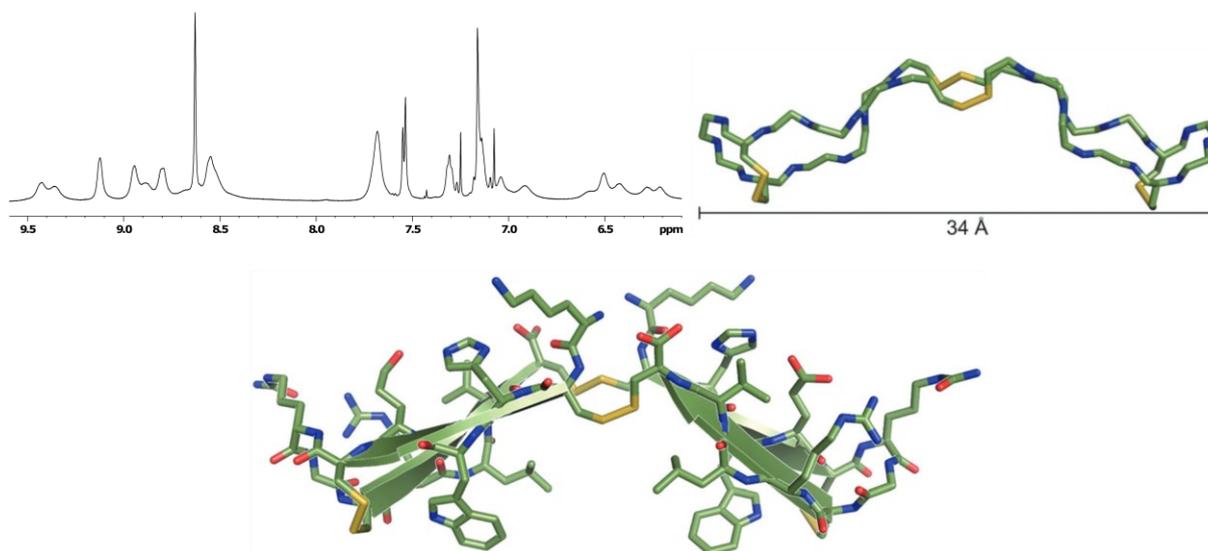


Abbildung 26: Von SCHRIMPF *et al.* entwickelte Strukturmodelle des dimeren Tetradisulfids. Oben links: ^1H -NMR (600 MHz, 280 K, 50 mM Phosphatpuffer, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH = 3.0) zeigt die starke Verbreiterung des amidischen Protonenbereichs, was auf eine konformationelle Änderung des Peptids hindeutet.^[275] Oben rechts: Gemittelte Konformation des Tetradisulfids, bestimmt durch Ionenmobilitätsspektrometrie mit einer Ausdehnung von 34 Å.^[275] Unten: Strukturabbild des Tetradisulfids mit expliziter Darstellung sämtlicher Seitenketten, auf Basis von NMR-Daten und einer kurzen MD-Simulation.^[275]

Wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, nimmt die gemittelte Konformation des Tetradisulfids eine V-förmigen Anordnung ein und stimmt damit mit dem experimentell bestimmten Streuradius von 34 Å gut überein. Den Autoren war es nicht möglich, mit den verwendeten analytischen Methoden, den

Bewegungsablauf vollständig aufzuklären, jedoch lieferten die experimentellen Daten Anhaltspunkte, die durch weiterführende Computer-gestützte Analysemethoden vervollständigt werden sollten. Die scharnierartige Bewegung, die zur massiven Verbreiterung der Signale im $^1\text{H-NMR}$ führten, kann in der einfachsten Betrachtung durch ein Öffnen und Schließen der β -*hairpins* zueinander ablaufen, wie in der Publikation von SCHRIMPF *et al.* demonstriert wurde.^[275] Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten Moleküldynamik-Simulationen des Tetradisulfids in Lösung durchgeführt werden. Diese werden in der Literatur routiniert angewandt werden, um Bewegungsabläufe von Peptiden oder Proteinen auf atomarer Ebene zu studieren.^[324,327,399] Da der Verlauf einer MD-Simulation in hoher Korrelation mit dem Ausgangspunkt, also der Startstruktur steht und die Koordinaten des dimeren Tetradisulfids in der Literatur nicht zur Verfügung standen, erfolgte zunächst die Berechnung eines NMR-Strukturensembles. Ausgehend von den NOE-Kontakten, wurde in Kombination mit dem Programmpaket *Xplor-NIH*^[400] ein *simulated-annealing* Zyklus durchlaufen, indem eine gestreckte Struktur bei hoher Temperatur simuliert und anschließend langsam runtergekühlt wird.^[401] Als Kraftfeld wurde eine Weiterentwicklung des CHARMM22-Kraftfelds, *eefx2* verwendet, das von TIAN *et al.* speziell für die Berechnung von NMR-Strukturensembles konzipiert wurde.^[402] Die erhaltenen Strukturen zeigen häufig noch sterisch ungünstige Wechselwirkungen in den Seitenketten, weshalb eine kurze MD-Simulation *in vacuo* mit dem *eefx2*-Kraftfeld im Verfeinerungsschritt durchgeführt wurde. Es konnte in der Literatur gezeigt werden, dass dadurch die native Konformation der biologischen Makromoleküle in einer darauffolgenden MD-Simulation in Lösung länger stabil blieben.^[402] Da das System eine intrinsische Beweglichkeit demonstriert, wurde gezielt nur ein geringer Satz an 23 NOE-*restraints* generiert, die in drei Kategorien (stark, mittel, schwach), abhängig ihrer Intensität eingeteilt wurden, wodurch einen größeren konformationellen Raum abgedeckt werden konnte.^[403] Um die experimentellen Bedingungen der Faltungsumgebung nachzustellen, wurde der N-Terminus der Sequenz (CHWECRGRLVC)₂ acetyliert und der C-Terminus deprotoniert. Aus den 5000 berechneten Strukturen zeigte die Selektion der 20 Konformationen mit der niedrigsten Energie eine große Übereinstimmung zwischen den einzelnen Strukturen, wobei kein Verstoß der NOE-*restraints* größer als 0.5 Å registriert wurde. Die so erhaltene Struktur (Abbildung 27) zeigt eine gute Übereinstimmung mit der von SCHRIMPF *et al.* postulierten C₂-symmetrischen Konformation. Dennoch sind Unterschiede zwischen den berechneten Strukturen ersichtlich. Die auffälligste Differenz lässt sich im Öffnungsdurchmessers der Scharnier-Peptide feststellen. Während die in der Literatur^[275] beschriebene Struktur eine geringe Abweichung zum experimentell bestimmten Streuradius aufweist, zeigt die energieniedrigste Konformation des NMR-Strukturensembles eine signifikant kleinere Distanz von 25 Å. Die Diskrepanz ergibt sich hierbei aus den unterschiedlichen Rahmenbedingungen, wie Berechnungsmethode, verwendetes Kraftfeld und Auswahl an NOE-Kontakten. Durch die gelockerten NOE-*restraints* in der, durch *simulated-annealing* berechneten Struktur, konnte ein größerer konformationeller Bereich an verschiedenen Konformationen abgedeckt werden, wodurch auch die abgebildete, vermeintlich stabilere Struktur erhalten wurde. Ein weiterer Unterschied lässt sich in der

Ausrichtung der einzelnen Seitenketten finden, wobei auch eine einzelne NMR-Struktur nur eine Momentaufnahme darstellt und daher die schnelle Gleichgewichte der einzelnen Seitenkettenkonformere nicht abgebildet werden können.

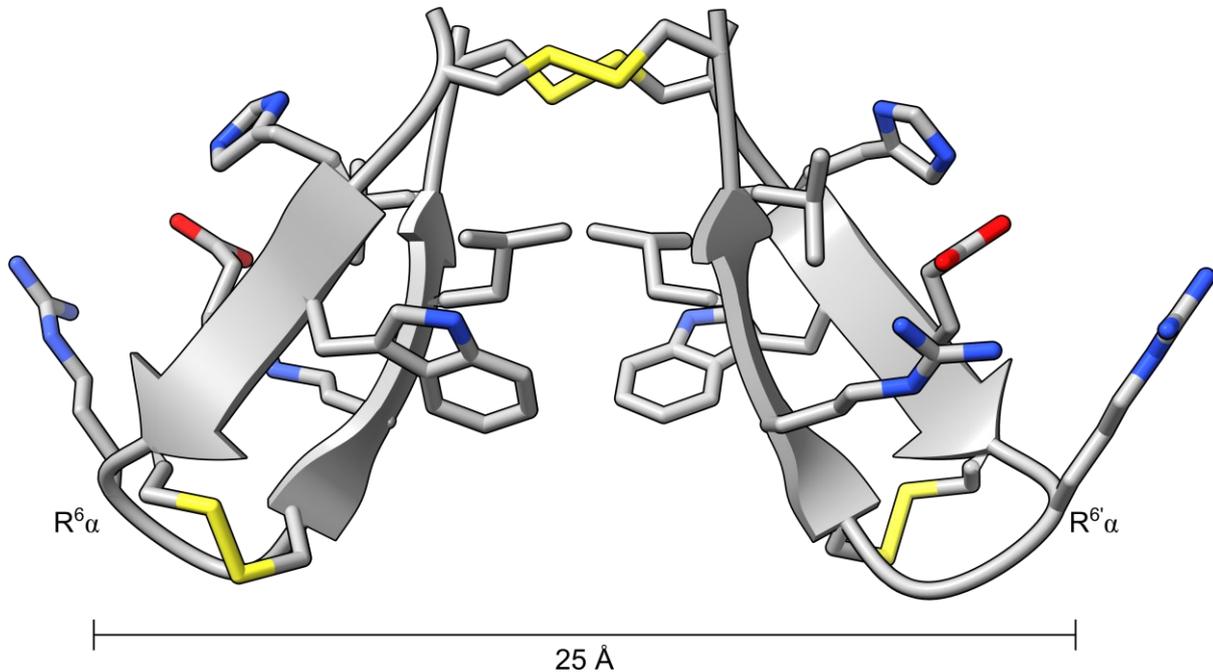


Abbildung 27: Startstruktur des dimeren Schmierpeptids, das nach dem *simulated-annealing*-Protokoll in Kombination mit NOE- und Diederwinkel-*restraints* erhalten wurden. Zur besseren Übersicht wurden die Wasserstoffatome entfernt. Die Ausdehnung des Tetradisulfids beträgt ca. 25 Å und wurde gemessen von $R^{6\alpha}$ zu $R^{6\alpha}$.

3.1.2 Die Wahl des passenden Kraftfeldes

Wie bereits im Kapitel 1.6.2 angemerkt, setzt sich die Dynamik eines biologischen Makromoleküls aus den einzelnen Bewegungen der Atome (Bindungslängenänderung, Winkeländerung *et cetera*), die durch eine Kombination von Energiefunktionen, dem Kraftfeld, beschrieben werden, zusammen. Die Wahl des Kraftfeldes kann einen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis einer Simulation ausüben, weshalb die Notwendigkeit besteht, unterschiedliche Kraftfeldfamilien zu evaluieren, um das Ausmaß dieses Einflusses abzuschätzen und etwaige Fehlinterpretationen vermeiden zu können. Zwar sind die generellen Kraftfeldterme zwischen den einzelnen Klassen sehr ähnlich, jedoch können gerade kleine Änderungen in der Beschreibung von Diederwinkeln zu drastischen Unterschieden bei der Faltungspopulation von Polypeptiden führen.^[404] Es wurde daher jeweils eine 300 ns-lange MD-Simulation des Schmier-Peptids in Lösung mit einem aktuellen Vertreter aus den drei prominentesten Kraftfeldfamilien durchgeführt. Nach Erhalt der Trajektorie, dem Ausgleichen der periodischen Grenzbedingungen (PBC) und Entfernen der Rotation sowie Translation des Peptids, kann die Analyse des dynamischen Verhaltens gestartet werden. Hier stellt sich zunächst die Frage, welche Parameter aussagekräftige Informationen über die Dynamik hervorbringen können. Ein grundlegender Faktor für

die Stabilität eines Proteins ist das Ausmaß der mittleren Distanz der Atomkoordinaten von einer gegebenen Konformation. Diese Beziehung wird *root-mean-square-deviations*, kurz RMSD genannt und findet routinemäßige Anwendung als Qualitätskriterium bei dem Vergleich zweier Proteinstrukturen. Zudem kann über den Verlauf eines RMSD-Graphs beurteilt werden, ob das jeweilige System ein Gleichgewichtszustand erreicht hat.

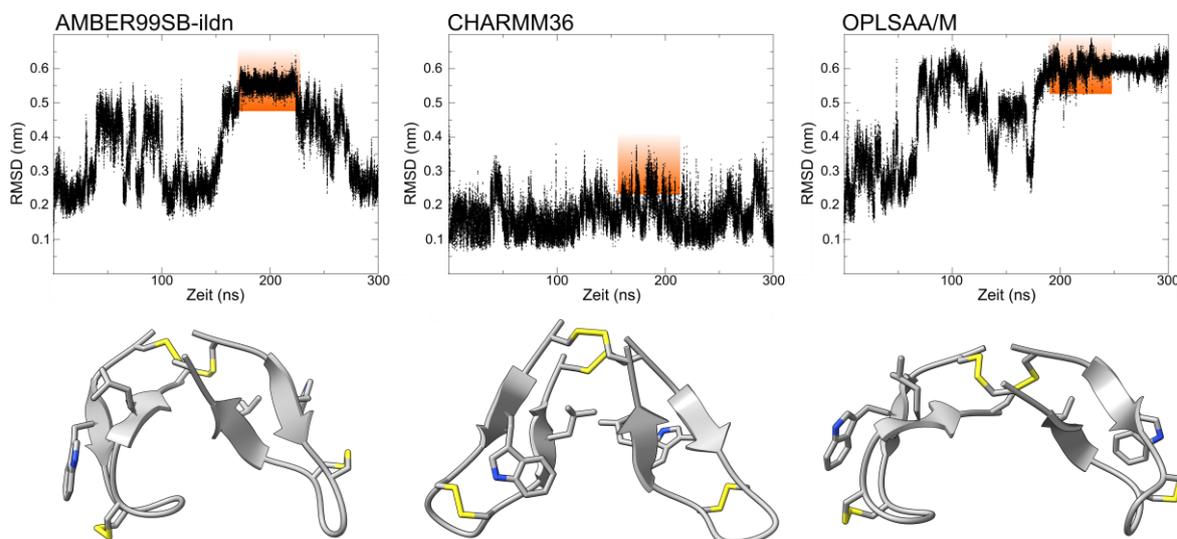


Abbildung 28: Obere Reihe: Verlauf der RMSD des Scharnier-Peptids für verschiedene Kraftfelder. Zu erkennen ist, dass CHARMM36 über die gesamten 300 ns eine geringe Abweichung zu seiner Startstruktur aufzeigt, während sowohl AMBER99SB-ildn als auch OPLS-AA/M eine unterschiedliche Konformation anstreben. Unten: Strukturen mit der höchsten RMSD (oben – oranger Bereich). Der Vergleich zeigt, dass sowohl AMBER99SB-ildn als auch OPLS-AA/M eine größere Verdrillung beider β -hairpins zueinander aufzeigen. Zusätzlich gelingt es in der Konformation im OPLS-AA/M Kraftfeld eine größere Ausdehnung, vergleichbar mit den experimentellen Daten, während der MD-Simulation zu erreichen.

Die Analyse des RMSD-Verlaufs (Abbildung 28) demonstriert den Einfluss unterschiedlicher Kraftfeldfamilien während einer MD-Simulation des Scharnier-Peptids. Auffällig ist, dass CHARMM36 eine geringe Abweichung zur Startstruktur aufzeigt, was der Tatsache geschuldet ist, dass *eefx2* auf der CHARMM-Parametrisierung beruht und daher ähnliche Energiefunktionen bei der Erstellung der NMR-Struktur ihre Anwendung fanden. Sowohl AMBER99SB-ildn als auch OPLS-AA/M zeigen hingegen, während des Simulationsverlaufs, mehrere Übergänge zwischen verschiedenen Konformationen. Obwohl beide ausgewählte Strukturen einen nahezu identische RMSD besitzen, ist ihre Konformation sehr verschieden, was in Abbildung 28 deutlich wird. Während AMBER99SB-ildn eine geringere Ausdehnung besitzt, erreicht die Struktur im OPLS-AA/M Kraftfeld eine Ausdehnung, die vergleichbar mit dem experimentellen Daten ist. Dennoch liefert die ausschließliche Betrachtung des RMSD in diesem Fall nur unzureichende Argumente für die Wahl des geeigneten Kraftfeldes. Das Scharnier-Peptid zeichnet eine intrinsische Dynamik aus, weshalb häufige Konformationsänderungen ein zusätzliches Kriterium darstellen. Ein offensichtlicher Parameter, der den vermuteten scharnierartige Bewegungsablauf definieren kann, ist die Ausdehnung des Peptids. Diese kann auf einen einfachen geometrischen Wert fokussiert werden, die Distanz zwischen den β -turns. Zunächst wurde die Distanz der α -Kohlenstoffe von Glycin⁷ im β -turn verwendet. Genauere Betrachtung der Trajektorie enthüllte

jedoch, dass hierbei die Beweglichkeit des dimeren Tetradisulfids verfälscht wurde, da der β -turn an sich eine Flexibilität besitzt, die Messwerte um mehrere Angström verschieben kann. Eine präzisere Beschreibung der Ausdehnung des Scharnier-Peptids, die trotzdem auf der Distanz beider β -hairpins zueinander beruht, kann durch die Entfernung der internen Disulfidbrücken zueinander erfolgen. Um Ungenauigkeiten durch dynamische Prozesse innerhalb der β -hairpins zu vermeiden, wurde der geometrische Mittelpunkt zwischen den α -Kohlenstoffen der Cysteine (C^5/C^8 beziehungsweise C^5'/C^8') verwendet.

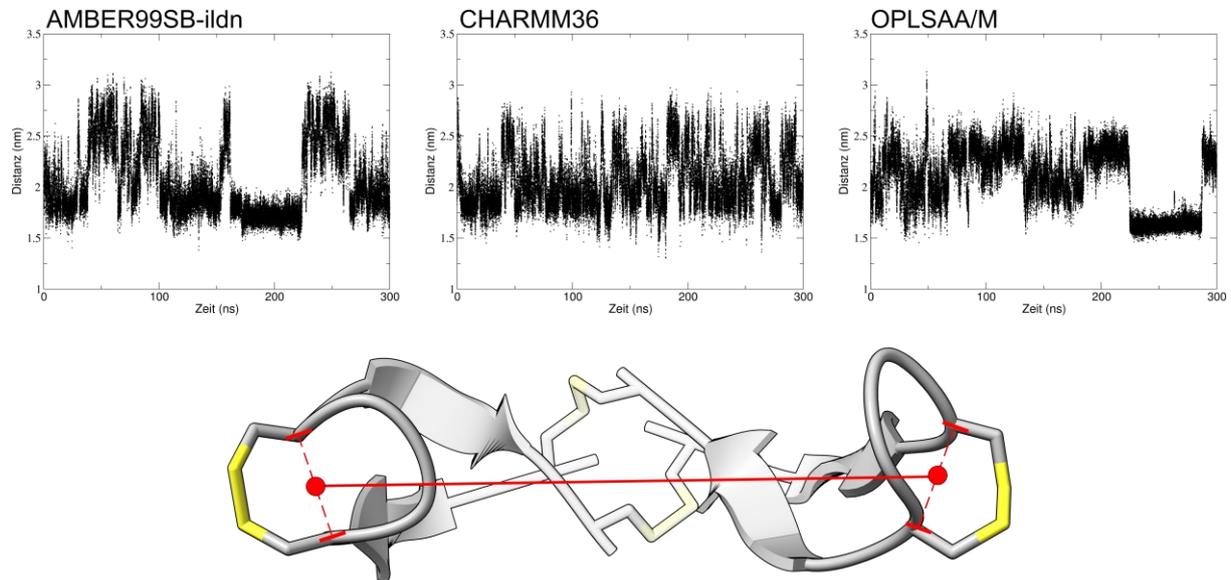


Abbildung 29: Verlauf der Ausdehnung des Scharnier-Peptids in einer MD-Simulation mit verschiedenen Kraftfeldern (oben). Die Distanz wurde aus den Mittelpunkten der α -Kohlenstoffe der intramolekularen Disulfide (unten) definiert.

Nach Auswertung der Graphen in Abbildung 29 wird ersichtlich, dass der Unterschied zwischen einzelnen Kraftfeldern von geringer Natur ist. Der Verlauf von CHARMM36 ist von einer Fluktuation um 2,25 nm geprägt und ist im Vergleich zum RMSD nahezu identisch. Diese Korrelation lässt sich auch auf AMBER99SB-ildn übertragen, wobei manche Abschnitte (Distanz 1,6 nm, RMSD 0,55 nm) eine umgekehrte Abhängigkeit aufweisen. Dieses Verhalten kann nur bedingt auf OPLS-AA/M übertragen werden. Der Verlauf der Distanz ist in unregelmäßigen Intervallen korreliert, während in der überwiegenden Zeit, beide Graphen unabhängigen Verläufen folgen. Ausgehend von diesen kurzen Testsimulationen wurde OPLS-AA/M als Kraftfeld für weitere intensivere Studien ausgewählt. Die Auswertung von RMSD und Ausdehnung deuteten darauf hin, dass mehrere Aspekte der Dynamik in diesem Kraftfeld simuliert wurden. Das gewählte Vorgehen sollte jedoch nicht als vollumfängliche und fehlerfreie Betrachtung angesehen werden, da die kurze Simulationszeit falsche Interpretationsmöglichkeiten durch nicht simulierte, seltene Ereignisse zulässt. Um diese potenzielle Gefahr abzuschwächen, wurden längere Simulation auch mit dem AMBER99SB-ildn Kraftfeld durchgeführt, die jedoch zu sehr ähnlichen Ergebnissen führten und daher im Rahmen dieser Arbeit nicht näher beschrieben werden.

3.1.3 Charakterisierung der Dynamik von Scharnier-Peptiden durch Moleküldynamik-Simulationen

Nachdem das entsprechende Kraftfeld ausgewählt wurde, sollte nun eine längere MD-Simulation des Scharnier-Peptids durchgeführt werden, um ein detailliertes Bild der Dynamik zu erhalten. Wie bei vielen Simulationsmethoden stellt sich auch in diesem Fall die Frage nach der Länge der Simulationszeit. Diese ist durch die verfügbare Hardware zwar begrenzt, sollte dennoch lang genug sein, um seltene Ereignisse (z.B. Verschiebung gesamter Sekundärstrukturelemente) statistisch relevant simulieren zu können.^[405] Ein Beispiel für dieses Phänomen zeigt die Arbeit von GODWIN *et al.* die verschiedene Simulationsdauern eines Zinkfingerpeptids gegenübergestellt haben und zeigen konnten, dass selbst nach 1 μs Simulationsdauer noch Konformationsänderungen entdeckt wurden, die für die Aufklärung der Gesamtdynamik eines Miniproteins von Bedeutung sind.^[406] Ein Anhaltspunkt für die Länge der Simulationszeit von β -hairpins lässt sich in der Literatur finden, wobei NIEBLING *et al.* und DEPLAZEZ *et al.* jeweils mehrere Mikrosekunden Gesamtsimulationszeit für ihre disulfidreichen β -hairpins verwendeten.^[407,408] Als ein guter Kompromiss aus Durchführbarkeit und Vergleichbarkeit mit der Literatur der letzten Jahre wurde daher 2.5 μs als Simulationszeit gewählt.

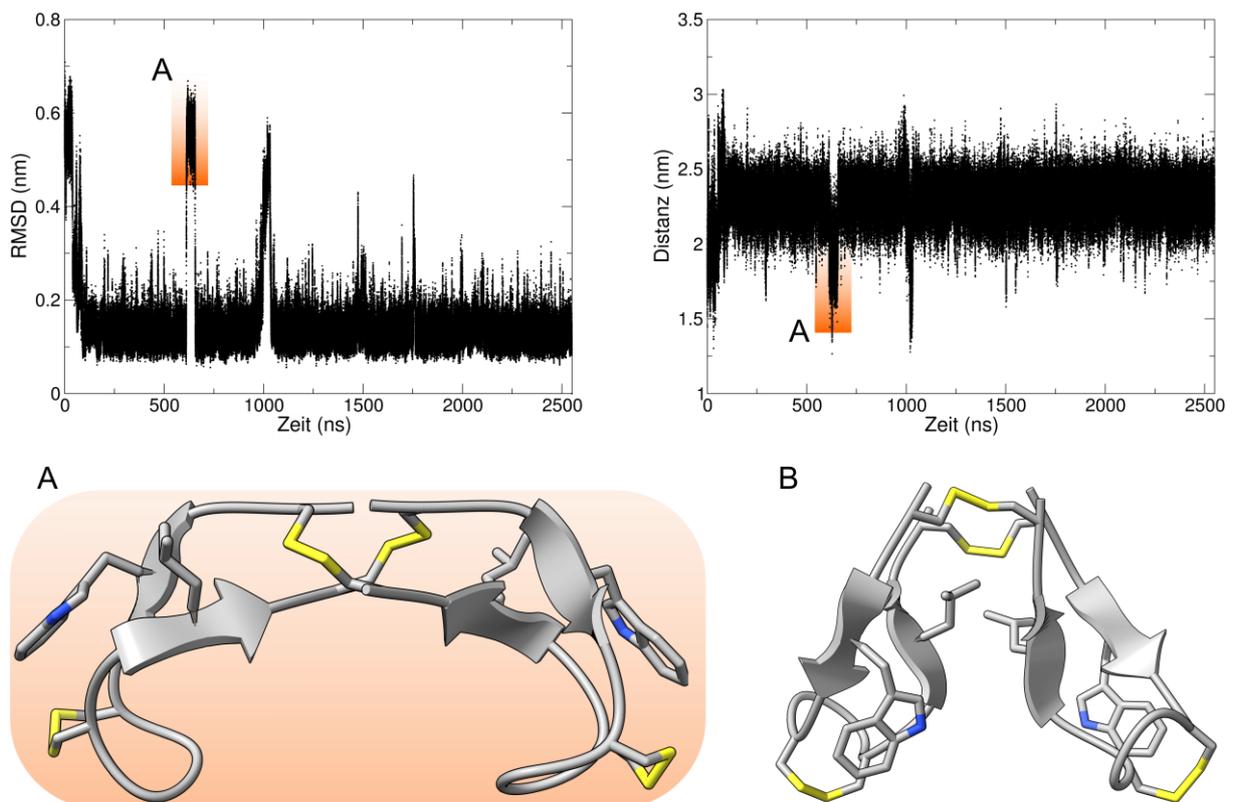


Abbildung 30: Zeitliche Entwicklung der MD-Simulation des dimeren Tetradisulfids mit dem OPLS-AA/M Kraftfeld (Oben). Links ist die Der RMSD-Verlauf gezeigt, der nach kurzer Äquilibration nur zwei Sprünge während der gesamten Simulationszeit aufweist. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Graph der Distanzänderung, der zum selben Zeitpunkt in die entgegengesetzte Richtung einen Ausschlag zeigt. Die Struktur mit dem größten RMSD und niedrigster Distanz (orange, A) wurde markiert und zeigt das Tetradisulfid in einer gestreckten und verdrillten Konformation. Für die RMSD wurde die Struktur am Ende der Simulation gewählt (B).

Die intrinsische Dynamik, die durch experimentelle Methoden (NMR, IMS) bestimmt wurde, lässt sich nur bedingt durch klassische MD-Simulationen wiedergeben (Abbildung 30). Sowohl der Verlauf der RMSD als auch die Cys-Cys-Distanz zeigt während der 2.5 μ s Simulation nur wenige Fluktuationen. Die Konformation bei 650 ns mit einer hohen RMSD wurde extrahiert, besitzt jedoch nur eine geringe Ausdehnung von 1.7-2.0 nm. Als Referenzstruktur wurde die letzte Struktur der Trajektorie verwendet, die eine ähnliche Cys-Cys-Distanz, jedoch einen deutlich niedrigeren RMSD besitzt.

Die Ergebnisse aus Abbildung 30 heben die Limitation der Kombination aus RMSD und die Distanz für die detaillierte Betrachtung der Dynamik des Scharnier-Peptids hervor. Zudem gestaltet sich die Auswahl von systemrelevante Bewegungsparameter aus der visuellen Betrachtung der Trajektorie als schwierig, da schnelle, lokale Fluktuationen die langsamen, häufig biologisch relevanten Bewegungen überlagern. Um dieses Problem zu lösen, entwickelten BERENDSEN und seine Mitarbeiter eine Methode, um die essenzielle Dynamik von Proteinen aufzudecken.^[396] Sie verwendeten die Diagonalisierung der Kovarianzmatrix (s. Kapitel 1.7.4), die sich aus der Änderung der kartesischen Atomkoordinaten zusammensetzt und erhielten dadurch einen Teilraum, der die essenziellen Fluktuationen des Proteins enthält und durch wenige Freiheitsgrade beschrieben werden kann.^[396] Diese Annahme kann durch die Auftragung in einem *Scree*-Plot verifiziert werden. Die essenzielle Dynamik-Methode von BERENDSEN *et al.* basiert auf der Hauptkomponentenanalyse, die erstmalig von PEARSON formuliert und später für Proteine weiterentwickelt wurde.^[388] Um diese Reduktionsmethode auf den multidimensionalen Raum einer Peptidtrajektorie anwenden zu können, wurde zunächst die Position der Rückgratatome aneinander ausgerichtet und anschließend die Kovarianzmatrix aufgestellt. Anschließend zeigt die Auftragung der Eigenvektoren mit ihrer entsprechenden Varianz im *Scree*-Plot, dass die ersten zehn Vektoren 82% der Gesamtvarianz des Peptids abbilden. Die ersten beiden Eigenvektoren wiederum geben sogar 55% und 11% der Kovarianz wieder, sodass nach dem Kriterium des *Scree*-Plots die Hauptkomponentenanalyse in der Lage war, die wichtigsten Fluktuationen zu identifizieren. Die Visualisierung dieser essenziellen Bewegungen erfolgte durch Projektion der ersten beiden Eigenvektoren auf die Trajektorie (Abbildung 31).

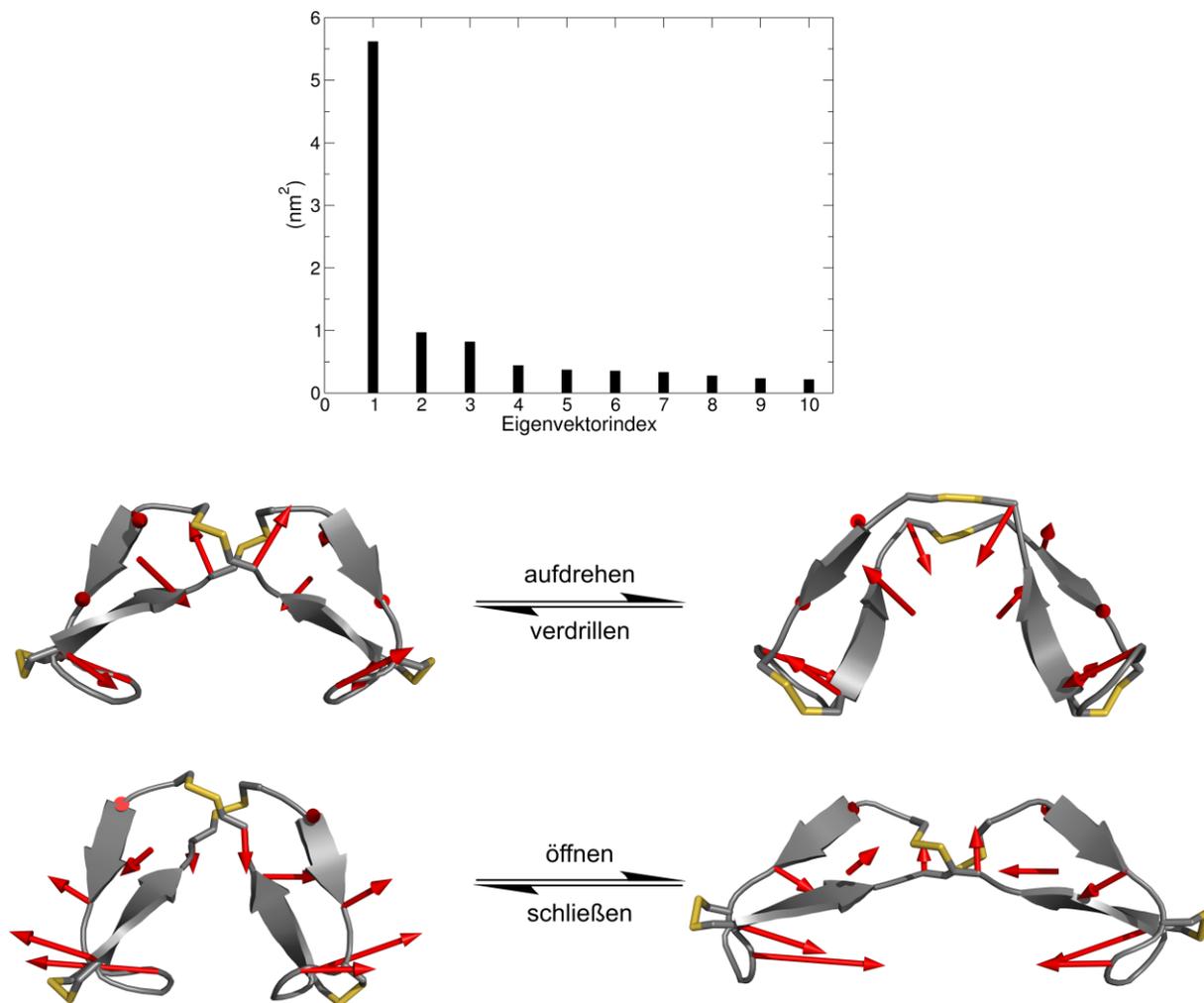


Abbildung 31: Reduktion der multidimensionalen Trajektorie des Scharnier-Peptids. Oben: *Scree-Plot*, der nach der Diagonalisierung der Kovarianzmatrix, basierend auf den kartesischen Atomkoordinaten der Rückgrat-Atome des Scharnier-Peptids erhalten wird. Es ist ein deutlicher Knick im Verlauf der Balken zu erkennen, was auf eine ausreichende Beschreibung der Varianz des Systems durch die ersten Eigenvektoren hindeutet. Mitte: Projektion des ersten Eigenvektors (55% der Gesamtvarianz) auf die Trajektorie visualisiert die essenzielle Dynamik des Systems nach BERENDSEN *et al.*, dem Verdrillen der β -hairpin zueinander.^[396] Der zweite Eigenvektor (unten, 11% der Gesamtvarianz) demonstriert das Öffnen und Schließen des gesamten Scharnier-Peptid, postuliert von SCHRIMPF *et al.*^[275] Die roten Vektorpfeile geben die Richtung der Atomfluktuation, sowie das Ausmaß der Änderung an.

Die Bewegung des ersten Eigenvektors zeigt ein Verdrillen der β -hairpin Struktur motive zueinander, während der zweite Eigenvektor ein Öffnen und Schließen des Scharnier-Peptids darstellt. Die von SCHRIMPF *et al.* postulierte Scharnier-Bewegung des Tetradisulfids stellt somit nur einen geringen Teil der Hauptbewegung dieses Polypeptids dar.^[275] Hierdurch wird ersichtlich, dass ein ausschließlicher Fokus auf die Ausdehnung des Scharniers unzureichend für eine vollständige Beschreibung der Dynamik des Scharnier-Peptids ist. Vielmehr wäre die Kombination aus Ausdehnung und Verdrillung ein idealer Parameter, um den Bewegungsablauf zu charakterisieren. SALEMME charakterisierte diese Verdrehung des β -hairpin-Motivs als Bildung einer rechtsgängigen Doppelhelixstruktur mit isoenergetischer Biegung der Wasserstoffbrückenbindungen, die die Symmetrie aufrechterhält und damit die Gesamtstruktur stabilisiert.^[409] Es gilt nun eine einfache Kenngröße zu finden, die eine

adäquate Beschreibung der Verdrillung erlaubt. Sowohl der Vergleich beider Strukturen in **Abbildung 31**, als auch die Analyse des ersten Eigenvektors enthüllen, dass bei einem Verdrehen der β -hairpins sich die Seitenketten entfernend beziehungsweise annähernd. Um die Ungenauigkeit von schnellen lokalen Fluktuationen einer flexiblen Seitenkette zu vermeiden, wurde der Indolrest der Tryptophane ausgewählt, da diese durch ihr sterisches Ausmaß ein großes Trägheitsmoment und daher eine geringe Mobilität aufweisen. Um ein detailliertes Bild von dem konformationellen Raum, der dem Tetradisulfid zur Verfügung steht, zu erlangen, sollte nun die Auftragung dieser beiden Parameter, der Verdrillung und der Ausdehnung zueinander erfolgen. Der so erhaltene zweidimensionale Plot könnte zusätzliche Informationen über die Beweglichkeit des Scharnier-Peptids enthalten, indem unterschiedlich stark populierte Strukturgruppen, so genannte Cluster auftreten. Im makroskopischen Bereich erfolgt die Charakterisierung eines Scharniers üblicherweise nicht durch die Ausdehnung der beider flexiblen Elemente zueinander, sondern über einen Öffnungswinkel. Dieser Parameter sollte nun auf die atomare Beschreibung des Scharnier-Peptids übertragen werden. Hierzu wurden erneut die Mittelpunkte zwischen den α -Kohlenstoffen der intramolekularen Disulfidbrücken (C^5/C^8 und C^5'/C^8') verwendet, sowie der Mittelpunkt der vier Schwefelatome, die den intermolekularen Disulfidcluster ausbilden ($C^1/C^{12}/C^{1'}/C^{12'}$). Diese drei Koordinaten definieren den Öffnungswinkel. Die Verdrillung wird durch die Distanz der Tryptophane zueinander charakterisiert, wobei auch hier der geometrische Mittelpunkt sämtlicher schweren Atome der Seitenkette verwendet wurde.

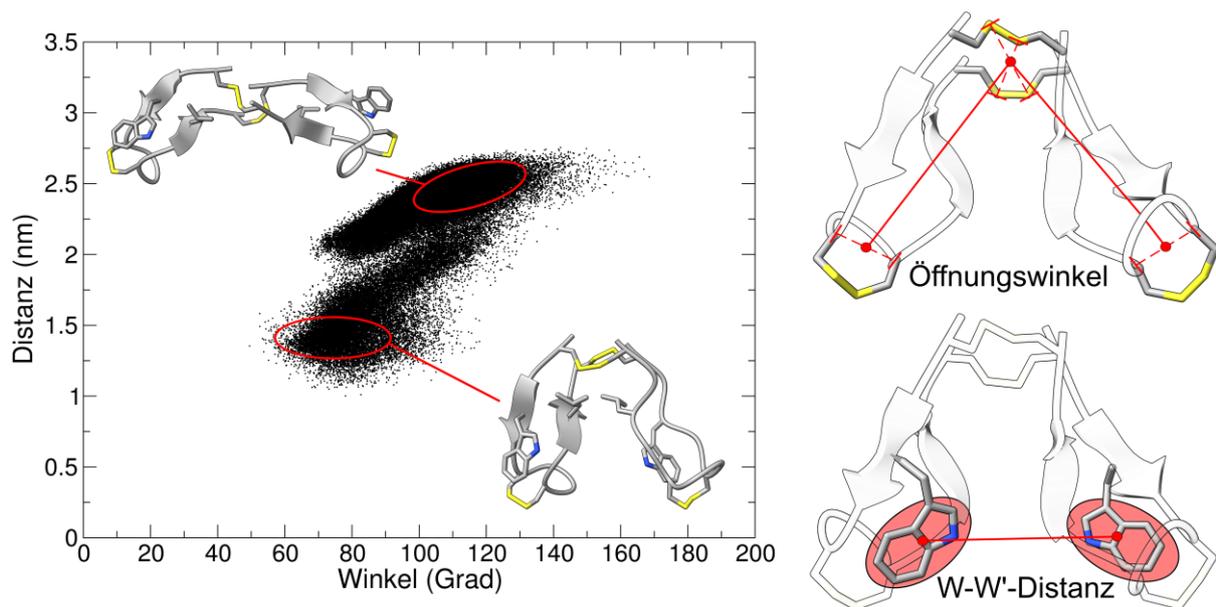


Abbildung 32: Konformationeller Raum, der durch den Öffnungswinkel und die Tryptophandistanz des Scharnier-Peptids während einer klassischen MD-Simulation definiert wird. Im Plot sind zwei Cluster mit hoher Population gekennzeichnet und stellen eine geöffnete und geschlossene Konformation dar, jeweils mit einer großen Verdrillung. Unten: Definition der X-Achse – Öffnungswinkel, der aus den Mittelpunkten der α -Kohlenstoffatome von C^5/C^8 beziehungsweise C^5'/C^8' und den Schwefelatomen des Disulfidclusters $C^1/C^{12}/C^{1'}/C^{12'}$ definiert wird, sowie der Y-Achse: Verdrillung/Distanz der Tryptophane, die aus den Mittelpunkten der Seitenkette definiert ist.

Der konformationelle Raum, der innerhalb der 2,5 μ s MD-Simulation erkundet wurde, lässt zwei markante Bereiche erkennen. Zunächst konnte ein Bereich mit einem Öffnungswinkel von 75-125° und

einer engen Auswahl des W-W'-Abstands von 2.3 nm identifiziert werden. Der zweite Strukturcluster umfasst einen kleineren Bereich des Öffnungswinkels von 70-100°, mit einer größeren Distanzvariation von 1.25-2.00 nm. Anhand der Form der Cluster, in Kombination mit der Population kann zudem ein Bewegungsablauf des Scharnier-Peptids abgeschätzt werden. Wird von einer Startkonformation mit geringem Öffnungswinkel und geringer Verdrillung (W-W'-Distanz) ausgegangen, so lässt sich die Hypothese formulieren, dass kein direkter Übergang zu einer größeren Verdrillung möglich ist, ohne gleichzeitig auch das Scharnier weiter zu öffnen. Bevor weitere Analysemethoden angewandt werden sollten, muss jedoch die grundlegende Fragestellung einer MD-Simulation weiter untersucht werden - Deckt die Moleküldynamik-Simulation einen ausreichenden konformationellen Raum ab, oder sind manche Strukturen in lokalen Minima gefangen und nicht in der Lage, benachbarte Energiebarrieren zu überschreiten. Dieser Fragestellung soll sich im nächsten Kapitel näher gewidmet werden.

3.1.4 Die Limitation der Moleküldynamik-Simulation

Bereits zu Beginn der Simulation wurden Überlegungen zur notwendigen Simulationsdauer durchgeführt. Eine Literaturrecherche zeigte, dass verschiedene β -*hairpin*-Motive über einen Zeitraum von mehreren Mikrosekunden simuliert wurden, weshalb die gewählte Simulationszeit des dimeren Tetradisulfids zunächst sinnvoll erscheint. Ein besseres Indiz wäre die Validierung durch experimentelle Messwerte. Da das dimere Scharnier-Peptid ein neues Epitop darstellt, ist die Anzahl an bisherigen experimentellen Untersuchungen begrenzt. Um dennoch abwägen zu können, ob das System seinen verfügbaren konformationellen Raum effektiv erkundet, ohne an dem Überqueren von lokalen Energiebarrieren zu scheitern, können einzelne Parameter der Simulation verändert, und deren Einfluss auf das Verhalten des Scharnier-Peptids evaluiert werden. Da die verfügbare Energie eines Peptids eine direkte Abhängigkeit zur Temperatur des Systems zeigt, stellt dies den einfachsten Parameter dar, um die Erkundung eines größeren konformationellen Raums zu erleichtern. Abbildung 33 demonstriert den Effekt der Erhöhung der Simulationstemperatur auf 350K.

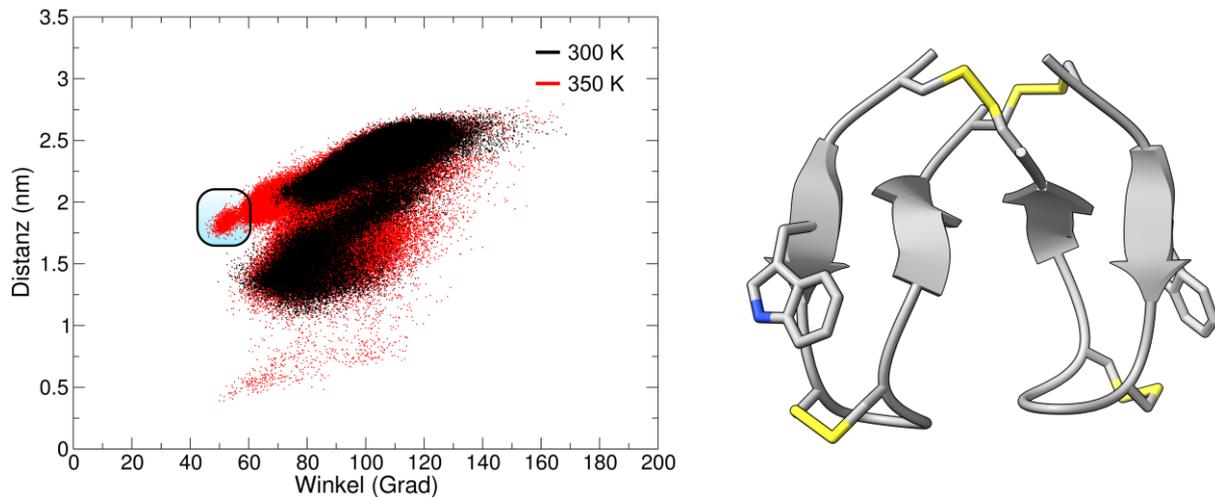


Abbildung 33: Effekt der erhöhten Temperatur auf die Dynamik des Scharnier-Peptids. Links: Zweidimensionale Betrachtung der Flexibilität des Scharnier-Peptids bei unterschiedlichen Temperaturen (schwarz: 300K, rot: 350). Die Simulation bei erhöhter Temperatur ist nicht nur in der Lage, einen größeren konformationellen Raum abzudecken, sondern auch neue Bereiche zu erkunden (hellblau gekennzeichnet). Rechts: Die schematische Darstellung des, im linken Plot markierten Bereichs, zeigt eine Konformation mit einem geringen Öffnungswinkel und einer stärkeren Verdrillung. Diese Anordnung wurde während der Simulation bei Raumtemperatur nicht erhalten.

Die Steigerung der Simulationstemperatur auf 350 K ermöglicht dem Scharnier-Peptid eine niedrigere Energiebarriere zu überqueren und damit neue Bereiche zu erkunden. Neben dem in Abbildung 33 markierten und dicht populierte Cluster, sind vereinzelt auch Strukturen erkennbar, die einen deutlich geringeren W-W'-Abstand besitzen. Jedoch ist die Dichte dieser Cluster sehr gering, was auf eine hohe Energiebarriere schließen lässt. Durch die geringe Abdeckung dieses Bereichs würden statistische Analysemethoden jedoch zu einer fehlerbehafteten Schlussfolgerung führen. Eine Erhöhung der Temperatur auf 400 K wurde evaluiert, jedoch konnte während der Simulation eine Entfaltung des Strukturmotivs beobachtet werden. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, könnten Einschränkungen des Peptidrückgrats eingeführt werden, die den β -hairpin stabilisieren. Von dieser Modifikation wurde abgesehen, da durch die strukturellen Restriktionen der konformationelle Bereich zu stark verfälscht werden könnte. Das Problem des limitierten „samplings“ ist für MD-Simulation in der Literatur omnipräsent, was viele Forschungsgruppen motivierte, neue Methoden zu entwickeln, um den verfügbaren konformationellen Bereich effektiver simulieren zu können.^[357-359] PARRINELLO *et al.*^[360] demonstrierten im Jahr 2002 ihren Ansatz, MD-Simulationen gezielt zu beschleunigen und nannten diese Metadynamik. Um diese Methode anzuwenden, muss zunächst eine Reaktionskoordinate, im folgenden Verlauf dieser Arbeit als kollektive Variable bezeichnet, beziehungsweise mit CV (engl. *collective variable*) abgekürzt, identifiziert werden. Bei einfachen Prozessen, wie die von PARRINELLO und Mitarbeitern untersuchte Dissoziation von Natriumchlorid in Lösung, ist die Auswahl einer geeigneten kollektiven Variable zwar unkompliziert, jedoch wird dieser Prozess bei der Übertragung auf Proteinsysteme durch den enormen Anstieg an Freiheitsgraden erschwert. Zudem sollte die CV alle für den untersuchten Prozess wichtigen, meist langsamen Bewegungen enthalten, da ansonsten ungenaue oder gar falsche Ergebnisse erhalten werden. Um diesem Problem im Fall des dimeren

Tetradisulfids entgegenzuwirken, wurde erneut die Hauptkomponentenanalyse verwendet. Da eine möglichst ausführliche Beschreibung des Bewegungsablaufes erfolgen soll, sind die ersten zwei Eigenvektoren, die aus der PCA erhalten wurden und den Großteil der Fluktuation des Peptids beschreiben ideale kollektive Variablen. Zwar ist eine direkte Implementierung der Eigenvektoren in die Metadynamik möglich, jedoch benötigen die dadurch entstehenden Auftragungen der Hauptkomponenten ein wenig mehr Vorstellungskraft und verhindern eine direkte Beschreibung der Dynamik. Daher wurden die in Abbildung 33 verwendeten Größen, W-W'-Distanz und der Öffnungswinkel als CV ausgewählt. Die Kombination von mehreren kollektiven Variablen innerhalb einer Metadynamik ist möglich, jedoch wird hierdurch der Berechnungsaufwand größer, wodurch mehr Ressourcen zur Simulation der 2550 ns benötigt werden. Um zudem eine gute Vergleichbarkeit der Parameter zu ermöglichen, wurde zunächst nur der erste Eigenvektor, die Verdrillung (abgebildet durch den W-W'-Abstand) als kollektive Variable verwendet. Innerhalb der Metadynamik wird nun in einem bestimmten Zeitintervall an der Position der Reaktionskoordinate ein Gaußpotenzial abgelegt, was dazu führt, dass das Scharnier-Peptid entmutigt wird, diesen Bereich der Simulation erneut abzudecken und stattdessen neue, unbekannte Konformationen zu erkunden. Falls das System also in einem lokalen Minimum gefangen sein sollte, sorgt die Summe der Gaußpotenziale nach einer bestimmten Zeit dafür, dass diese verlassen werden können. Um ein "Überfüllen" der Minima zu vermeiden und dadurch in physikalisch unrealistische Bereiche vorzustoßen, wurde der *well-tempered*-Formalismus von PARRINELLO *et al.* wenige Jahre später zur Metadynamik hinzugefügt.^[380] Sämtliche Metadynamiken in dieser Arbeit, erfolgten unter Verwendung dieser Modifikation. Durch den Vergleich der bisher beschriebenen Dynamikparameter (RMSD, W-W'-Abstand und Öffnungswinkel), kann der Einfluss der Metadynamik auf das konformationelle Verhalten des Scharnier-Peptids charakterisiert werden.

Da die Hauptkomponentenanalyse schnelle Fluktuationen mit einer geringen Amplitude herausfiltert, um eine Identifikation der langsamen, meist biologisch wichtigen Bewegungen zu ermöglichen, können hierdurch Informationen der Beweglichkeit von einzelnen Seitenketten oder Strukturelementen verloren gehen, die dennoch wichtig für die vollständige Beschreibung der Dynamik sind. Neben dem RMSD, ist die *root-mean square fluctuation* (RMSF) ein weiterer Parameter, der routinemäßig auf Trajektorien von Peptiden und Proteinen angewandt wird, um Aminosäuren zu identifizieren, die eine erhöhte Flexibilität zeigen.^[410] Sie gibt an, wie groß die Abweichungen um ihren Mittelwert sind. Die Berechnung der RMSF-Werte erfolgten separiert für die Rückgratotope und Seitenkettenatome. Zwar besitzt das dimere Scharnier-Peptid in der NMR-Struktur eine C₂-Symmetrie, die jedoch nicht dem dynamischen Abbild innerhalb einer MD-Simulation entsprechen muss. Eine Analyse der RMSF-Werte, aufgeschlüsselt für die einzelnen Ketten, zeigte eine geringe Differenz, weshalb die Auftragung der gemittelten Werte erfolgt.

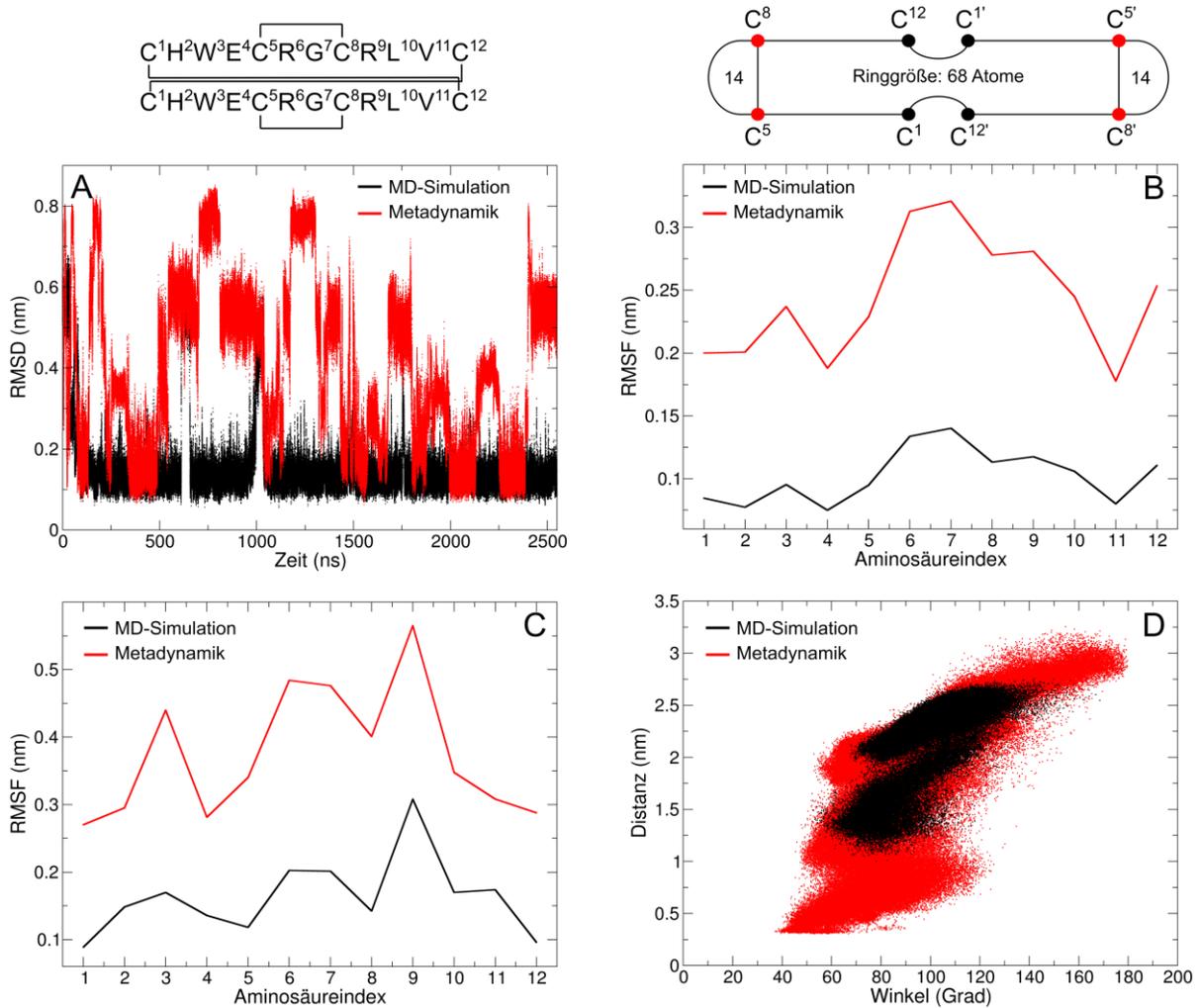


Abbildung 34: Oberste Reihe: Primärsequenz des dimeren Tetradisulfids, mit expliziter Darstellung der Disulfidbrücken, wodurch mehrere Ringe mit unterschiedlicher Größe ausgebildet werden. Auswirkung der Metadynamik auf unterschiedliche Beweglichkeitsparameter des Scharnier-Peptids. Im Fall der RMSD (A) werden nicht nur größere Werte erreicht, die Anzahl an Übergängen zwischen verschiedenen Konformationen steigt erheblich. Die *root-mean-square* Fluktuation (RMSF) ist ein Ausmaß für die Flexibilität einzelner Aminosäuren um ihren Mittelpunkt. Die Analyse der Rückgratotope (B) beschreibt selbst in der klassischen MD-Simulation mehrere Charakteristika von β -hairpins, die erhöhte Flexibilität der *turn*-Region (R^6+G^7), sowie den stabilisierenden Einfluss von Disulfidbrücken (C^5+C^8). Dieses Verhalten wird, bis auf den Absolutwert, nahezu identisch während der Metadynamik wiedergegeben. Die Fokussierung des RMSF-Verlaufs auf die Seitenkettenatome zeigt ein ähnliches Bild (C), da erneut die Cysteinatome der Disulfide C^1 , C^5 , C^8 und C^{12} die geringste Fluktuation besitzen. Arginin⁹ weist in beiden Simulationstypen die größte Fluktuation auf, was auf die fehlenden geeigneten Partner zur Ausbildung von Salzbrücken zurückzuführen ist. Am prägnantesten wird der Einfluss der Metadynamik auf den konformationellen Raum (D) des dimeren Tetradisulfids deutlich. Neben den Bereichen, die auch während der MD-Simulation abgedeckt werden, erkundet das Scharnier-Peptid in der Metadynamik einen neuen Cluster mit geringem Winkel und kurzer W-W'-Distanz.

Der Vergleich der Analysemethoden bestätigt, dass die Metadynamik das konformationelle Verhalten des Scharnier-Peptides signifikant verändert. Es wurden nicht nur höhere RMSD-Werte bis zu 0.80 nm erreicht, sondern zusätzlich die Anzahl der Konformationsänderungen erhöht. Die Analyse der RMSF-Werte der MD-Simulation und Metadynamik demonstriert, dass die Graphen in ihrer Form unverändert bleiben und nur eine Erhöhung der absoluten Flexibilität zu beobachten ist. Die Rückgratotope der *turn*-Region (R^6 und G^7) zeigen signifikant größere RMSF-Werte, was eine Charakteristik von β -hairpin Motiven ist. Dieses Verhältnis wurde bei der Analyse der Seitenkettenfluktuationen verändert. Minimale

Werte von 0.1 nm wurden an den terminalen Cystein Seitenketten C¹ und C¹² beobachtet, was Hinweise für einen Scharniercharakter liefert, bei dem der Ankerpunkt starr, die Enden jedoch flexibel sind. Da R⁹, im Kontrast zu R⁶ nicht in der Lage ist, Salzbrücken mit E⁴ und dem C-Terminus auszubilden, besitzt es eine höhere Seitenkettenfluktuation. Dieses Verhalten wurde erneut in der Metadynamik erhalten. Als letzte eindimensionale Kenngröße um den Einfluss der Metadynamik zu beschreiben, sollte der Öffnungswinkel verglichen werden. Während der klassischen MD-Simulation zeigt dieser eine geringe Veränderung wodurch zwei Bereiche mit 80° und 110° ausgebildet werden. Die *wt*-Metadynamik beeinflusst dieses Muster massiv in beide Richtungen. Das dimere Tetradisulfid ist nicht nur in der Lage, eine nahezu vollständig gestreckte Konformation mit 170° zu erreichen, sondern komprimiert sich bis auf 40°. Abermals stieg zudem die Anzahl der Konformationsänderungen, wobei der Verlauf des Öffnungswinkels keine Abhängigkeit zum RMSD-Plot zeigt. Auch die zweidimensionale Betrachtung der Dynamik des Scharnier-Peptids lässt die gleiche Schlussfolgerung über den Einfluss der *wt*-MetaD zu, wobei das Ausmaß auf den konformationellen Raum hierbei sehr auffällig ist. Durch die Manipulation der Verdrillung der β -*hairpins*, dargestellt durch den W-W'-Abstand, erfolgt nicht nur in dieser Dimension eine Ausdehnung, sondern auch die Amplitude des Öffnungswinkels weitet sich im Vergleich zur klassischen MD-Simulation. Hierdurch wird das unzureichende *sampling* der klassischen MD-Simulation, selbst bei erhöhter Temperatur deutlich. Der neue Cluster, der unterhalb einer W-W-Distanz von 1 nm beginnt und einen geringen Öffnungswinkel zeigt, wurde vereinzelt auch während der Simulation bei erhöhter Temperatur erschlossen, jedoch mit einer statistischen Irrelevanz. Mit einer Distanz von 0.3 nm und 40°, spiegelt dieser Bereich Konformationen wider, in der die Tryptophane in engem Kontakt zueinander sind, während das Scharnier-Peptid nahezu vollständig geschlossen ist. Während bei geringem Öffnungswinkel der W-W'-Abstand eine gute Aussagekraft über die Verdrillung der β -*hairpin*-Motive besitzt, verliert dieser Parameter bei zunehmender Öffnung seine Genauigkeit. Die zweidimensionale Darstellung des konformationellen Raums erlaubt zwar eine detaillierte Betrachtung, jedoch können Aussagen über einen Bewegungsmechanismus noch nicht präzisiert werden. Zudem ist durch die Strukturdichte der Cluster keine Aussage über deren Wahrscheinlichkeit anhand ihrer Verteilung möglich. Um diese benötigten Informationen zu erhalten, soll im folgenden Abschnitt eine dritte Dimension dem erhaltenen Abbild hinzugefügt werden.

3.1.5 Betrachtung der Energiefläche eines Scharnier-Peptids

Im vorherigen Kapitel konnte demonstriert werden, dass die klassische MD-Simulation des dimeren Tetradisulfids nicht in der Lage ist, den konformationellen Raum, adäquat abzubilden. Dies wurde insbesondere durch den Vergleich der zweidimensionalen Projektionen des Öffnungswinkels in Abhängigkeit mit der β -*hairpin*-Verdrillung deutlich. Ein weiterer Vorteil der Metadynamik ist, dass

nach abgeschlossener Simulation das freie Energieprofil aus der Summe der abgelegten Gaußpotenziale direkt erhalten werden kann.

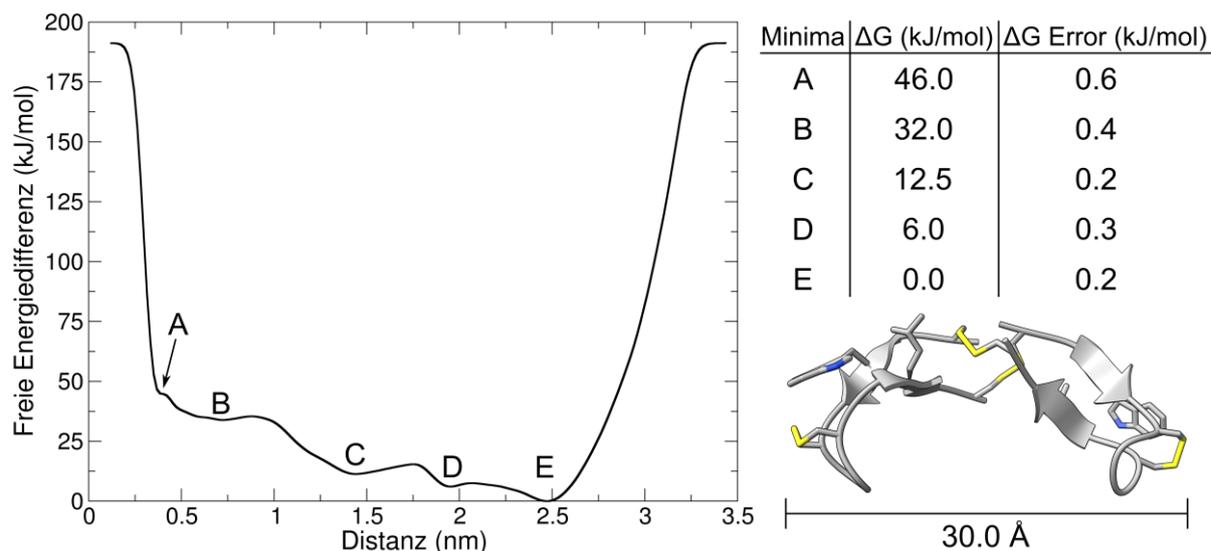


Abbildung 35: Eindimensionales Energieprofil des Scharnier-Peptids, erhalten nach der abgeschlossenen Metadynamik in Kombination mit den Energiewerten der Minima, sowie der Abschätzung des Fehlers der Freien Energie. Unten rechts: Beispielkonformation, die dem Energieminimum E entspricht, mit einer Ausdehnung von 30 Å. Die Distanz im Plot wurde durch den W-W'-Abstand dargestellt.

Das eindimensionale Energieprofil des dimeren Tetradisulfids (Abbildung 35) weist fünf definierte Minima auf. Das globale Minimum ist bei 2.5 nm lokalisiert und stellt die größte, energetisch favorisierte Entfernung dar, die das Scharnier-Peptid abdecken kann. Der Öffnungswinkel, der bei diesem Verdrillungswert angenommen werden kann, beträgt $90\text{-}130^\circ$ was einer teil-gestreckten Konformation entspricht. Werden Strukturen aus diesem Winkelbereich mit der jeweiligen Verdrillung extrahiert, so wird eine Hauptkonformation erhalten, mit einer Ausdehnung von 30 Å. Dieser Wert zeigt eine sehr gute Übereinstimmung zur Ausdehnung der gemittelten Struktur, die experimentell durch Ionenmobilitätsspektrometrie mit 34 Å bestimmt wurde. Eine detaillierte Gegenüberstellung der Strukturen von Abbildung 26 und 34 enthüllt jedoch einen entscheidenden Unterschied, die Verdrillung der β -hairpins. Während in dem Strukturvorschlag von SCHRIMPF *et al.*^[275] die Tryptophane auf der gleichen Seite liegen, ist in der durch Metadynamik bestimmten Konformation eine starke Verdrillung ersichtlich. Das gleiche Ergebnis wurde zudem nach der Analyse der NMR-Struktur erhalten, die eine geschlossene Konformation mit einer Ausdehnung von nur 24 Å aufweist. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede der einzelnen Strukturen liegt hierbei in den verwendeten Formalismen. Für die Berechnung eines NMR-Ensembles ist die Verwendung von *restraints*, die auf Basis von NOE-Kontakten generiert werden, unabdingbar, da die große Anzahl an Freiheitsgraden, während eines *simulated-annealing*-Vorgangs reduziert werden muss. Dies bietet jedoch die Möglichkeit für potenzielle Ungenauigkeiten. NMR-Spektroskopie ist eine Messmethode, in der dynamische Prozesse dargestellt werden können. Jedoch erfolgt bei schnellen Bewegungen eine Mittelung der Signale, wodurch NOE-Kontakte falsch interpretiert werden können. Da die Komplexität der spektroskopischen Systeme durch interne Bewegungen weiter gesteigert wird, können Fehlinterpretationen auch nur eines

NOE-Kontaktes zu komplett falschen Strukturen führen. Um diese Fehlerquelle zu vermeiden, erfolgten sämtliche Moleküldynamik-Simulation des Scharnier-Peptids innerhalb dieser Arbeit in Abwesenheit von NOE-Restraints. Das eindimensionale Energieprofil der Metadynamik enthüllt zudem, dass Energiebarrieren zwischen den einzelnen Minima existieren, die die Verbreiterung der NMR-Signale erklären können. Im Detail muss das dimere Tetradisulfid zwar zunächst nur 7 kJ/mol aufwenden, um zum nächsten Minimum D (1.9 nm) zu gelangen, jedoch werden 14 respektive 33 kJ/mol benötigt, um die Verdrillungswerte von 1.4 beziehungsweise 0.8 nm zu erreichen. Diese höheren Energiebarrieren liegen in dem Bereich, der für eine Verbreiterung der Signale im NMR-Spektrum verantwortlich sein könnte.^[411]

In Kapitel 3.1.3 wurde die Hauptkomponentenanalyse verwendet, um zwei Eigenvektoren zu identifizieren, die die Bewegungen des Scharnier-Peptids zu 66% beschreiben. Im vorherigen Absatz wurde jedoch nur die eindimensionale Energiefläche des ersten Eigenvektors der Verdrillung untersucht. Für eine umfassendere Beschreibung soll nun die energetische Analyse des zweidimensionalen konformationellen Raums erfolgen. Da der Eigenvektor mit der zweitgrößten Varianz nicht explizit während der Metadynamik beeinflusst wurde, muss die energetische Untersuchung anhand eines Histogramms durchgeführt werden. Wie in Abbildung 34 ersichtlich ist, hat die Metadynamik auch Einfluss auf den Öffnungswinkel. Um fehlerhafte Interpretationen des Histogramms, das durch die Metadynamik beeinflusst wurde, zu vermeiden, muss ein Neugewichtungsalgorithmus angewandt werden, der 2014 von TIWARY *et al.* beschrieben wurde.^[412] Dadurch kann der Effekt des *bias* auf die finale Energiefläche minimiert werden.

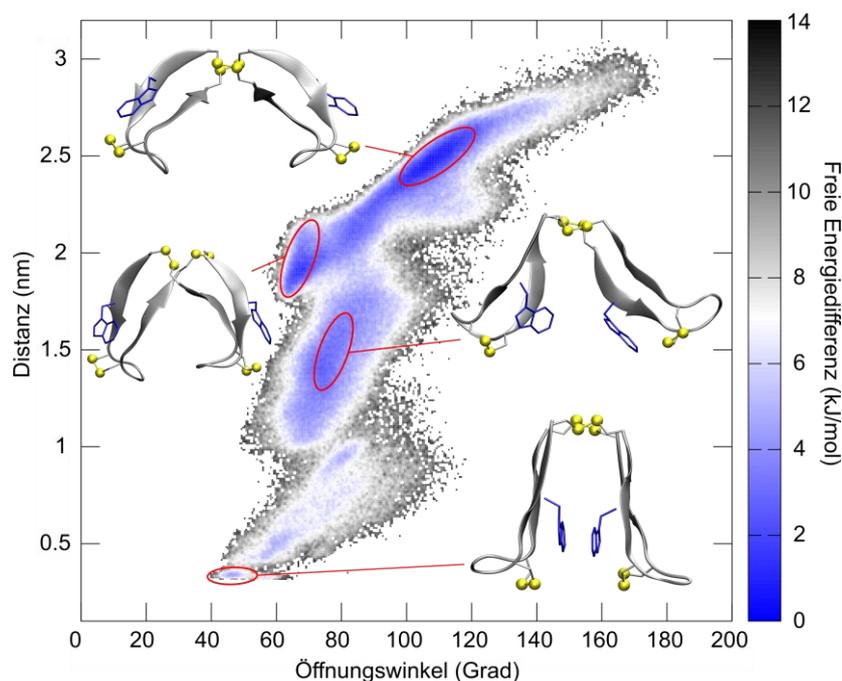


Abbildung 36: Dreidimensionaler konformationeller Bereich des Scharnier-Peptids, der durch die W-W'-Distanz und dem Öffnungswinkel definiert wird. Als dritte Dimension wurde die Differenz der Freien Energie hinzugefügt, die anhand eines Histogramms berechnet wurde. Hierzu erfolgt zunächst die Neugewichtung des *bias*, um den Einfluss der Metadynamik auf die Trajektorie zu reduzieren.^[412]

Der konformationelle Raum (Abbildung 36), der durch den Öffnungswinkel, den W-W'-Abstand und die freie Energiedifferenz als zusätzliche Dimension definiert wird, liefert das bisher detaillierteste Bild der intrinsischen Dynamik des Scharnier-Peptids. Im Vergleich mit Abbildung 34 bleiben die entsprechenden drei Hauptcluster erhalten, jedoch wird der Übergang zwischen den einzelnen Bereichen aufgedeckt. Die dunkelblaue Region mit einem Öffnungswinkel von 100-120° und einer Distanz von 2.5 nm entspricht dem Minimum E aus Abbildung 35 und bildet auch im zweidimensionalen konformationellen Raum die energiegünstigste Struktur. Eine Fokussierung einzig auf diese Anordnung wäre unzureichend, da eine niedrige Energiebarriere von ~4 kJ/mol den zweiten energetisch bevorzugten Bereich bei 65° und 2.0 nm, abgrenzt. Dieser Cluster kann also ausgehend von dem lokalen Energieminimum durch ein Schließen des Scharnier-Peptids erreicht werden, wobei der Verdrillungsgrad der β -hairpins zueinander erhalten bleibt. Der größte konformationelle Bereich, der weiterhin energetisch begünstigt ist, erstreckt sich von 60-100° und 1.0-1.8 nm. In diesem Zustand kann das dimere Tetradisulfid eine Öffnungs- und Schließbewegung ausführen, wodurch die Indolreste einander zugewandt werden und eine geringe Verdrillung erreicht wird. Während diese beiden Bereiche auch in der klassischen MD-Simulation erkundet wurden, ist der dritte Strukturecluster (40-100° und 0.4-1.0 nm) nur durch die Metadynamik erreichbar. Eine Vielzahl an engen Minima, separiert durch geringe Energiebarrieren von 4-5 kJ/mol, sind in dieser Region lokalisiert und beschreiben das Scharnier-Peptid in seiner komprimiertesten Konformation, mit geringster Verdrillung. Innerhalb dieses konformationellen Bereichs sind mehrere Ausrichtungen der Tryptophane zueinander möglich, sodass Wechselwirkungen wie *face-to-face*- π -Stacking (Abbildung 37) ermöglicht werden. Die Auswertung der freien Energiefläche enthüllt den Bewegungsablauf des Scharnier-Peptids, der aus der Kombination der Verdrehung der β -hairpins und Öffnen und Schließen des Scharniers zusammengesetzt ist. Zwar sind diese Regionen voneinander durch geringe Energiebarrieren voneinander getrennt, dennoch kann eine Abschätzung über den plausibelsten Bewegungsmechanismus anhand des Energieprofils getroffen werden. Ausgehend von der energetisch günstigsten Konformation erfolgt simultan die Verringerung des Öffnungswinkels, sowie der Verdrillung bis zu einem Wert von 80° und 2.0 nm. In der zweiten Phase drehen sich die β -hairpins mit konstantem Öffnungswinkel zueinander auf, wodurch der W-W'-Abstand auf 1.0 nm reduziert wird. Schlussendlich schließt sich das Scharnier-Peptid, wodurch sowohl der Winkel als auch die W-W'-Distanz auf die finalen Minimalwerte von 45° und 0.4 nm verringert werden. Der erste Abschnitt der Scharnierbewegung benötigt laut Abbildung 36 nur wenige kJ/mol, jedoch muss, um die letzte Region zu erreichen, eine Energiebarriere von ~12 kJ/mol überwunden werden. Diese Energiebarriere ist zu gering, um als allein stehende Begründung für die Verbreiterung der Signale im ¹H-NMR angesehen zu werden. Erst die Kombination aus Barriere und vielschichtigem Bewegungsablauf, der große Teile der Struktur des dimeren Tetradisulfids verändert, vervollständigt das Modell zur Beschreibung der intrinsischen Dynamik des Scharnier-Peptids.

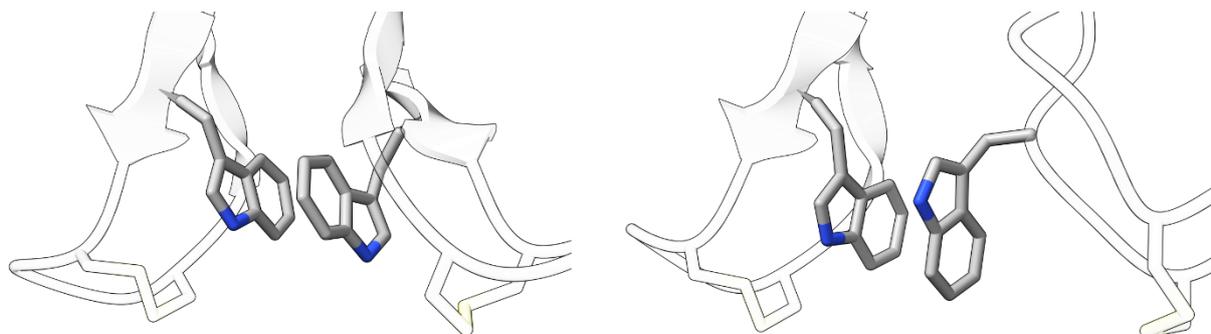


Abbildung 37: Ausschnitt zweier möglicher Ausrichtungen der Tryptophane im komplett geschlossenen Scharnier-Peptid. Durch die *face-to-face*-Anordnung der Indole wird π -stacking ermöglicht.

3.1.6 Kriterien für die Konvergenz der *well-tempered* Metadynamik

Die Interpretation des freien Energieprofils aus Kapitel 3.1.5 beruht auf der Annahme, dass es der Metadynamik gelang, den konformationellen Raum effizient zu erkunden und sämtliche Minima aufzufüllen. Dieser Umstand würde zur Konvergenz der Simulation führen und befindet sich im Fokus zahlreicher Studien in der Literatur. [380,384,413,414] Hierfür formulierten PARRINELLO *et al.* mehrere Schlüsselkriterien, die Hinweise auf eine abgeschlossene Simulation liefern können. Während einer Metadynamik wird an der Position der kollektiven Variable, an der sich das System befindet, ein Potenzial aus der Summe von GAUßfunktionen abgelegt. Wurden sämtliche Minima aufgefüllt und die Energiefläche dadurch geebnet, dürfte nur ein geringes Gaußpotenzial erforderlich sein, um einen neuen Bereich der Reaktionskoordinate zu erreichen. Der offensichtlichste Parameter, um die Konvergenz der Metadynamik abzuschätzen ist somit der zeitliche Verlauf der Höhe des Gaußpotentials. Da dieser Parameter als eigenständiges Merkmal jedoch nicht ausreichend wäre, erfolgt die gleichzeitige Betrachtung mit der kollektiven Variable, da nach einem Auffüllen der Minima dieser Wert, ohne die weitere Ablage des Gaußpotentials, sich konstant ändern sollte.

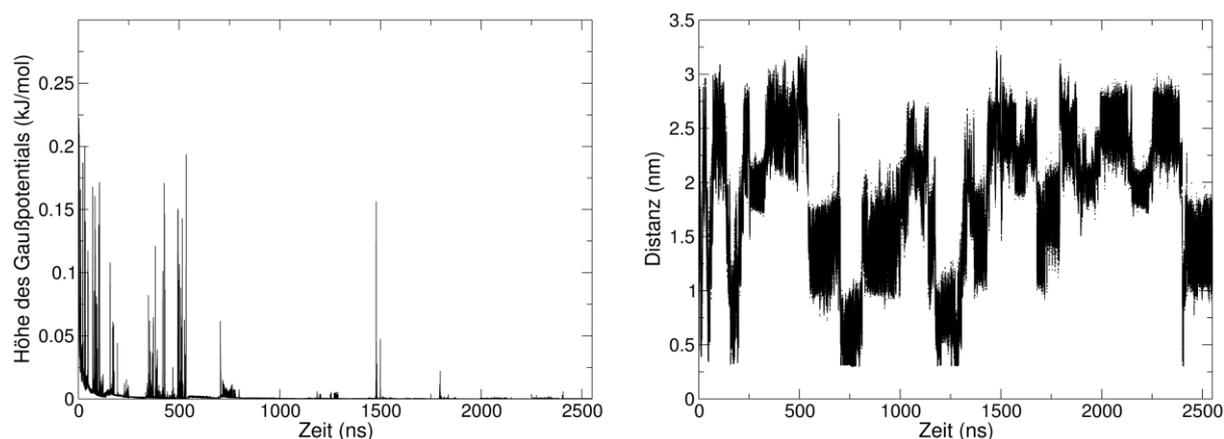


Abbildung 38: Evaluation der Konvergenz einer Metadynamik durch Analyse des Verlaufs des Gaußpotentials (links), in Kombination mit der kollektiven Variable (W-W'-Abstand, rechts). Zu erkennen ist ein rapides Abfallen der Höhe des Gaußpotentials, die schließlich auf einen Minimalwert nach 2000 ns konvergiert. Da sämtliche Minima der Energiefläche aufgefüllt wurden, ändert sich die kollektive Variable trotz eines niedrigen Gaußpotentials. Das Zusammenspiel beider Graphen ist ein Hinweis auf die Konvergenz der Metadynamik-Simulation.

Zu Beginn der Metadynamik wurden mehrere Gaußpotenziale mit nahezu vollständiger vorher definierter Höhe abgelegt (Abbildung 38 links). Bereits nach 150 ns folgte ein Abschnitt, in dem das Gaußpotential auf nahezu null absinkt, gefolgt von erneuter Deposition mit einer Höhe von 0.2 kJ/mol. Dieses Muster setzte sich während der Simulation fort, wobei sich ab 750 ns erneut ein langer Abschnitt anschließt, in dem nur sehr wenige Potentiale abgelegt wurden. Würde dieser Verlauf als einziges Kriterium für die Konvergenz herangezogen, hätte die Metadynamik nun abgebrochen werden können. Jedoch erfolgte bei 1500 ns erneut die Addition eines Gaußpotenzials, wodurch die Simulation fortgeführt wurde. Die Entwicklung der kollektiven Variable, der W-W'-Abstand im Scharnier-Peptid, zeigte während der gesamten Metadynamik konstante Fluktuation, selbst dann wenn kein Potential abgelegt wurde. Die Kombination aus beiden Beobachtungen ist ein gutes Indiz für die Konvergenz einer Metadynamik. Um diese Schlussfolgerung zu bekräftigen, werden jedoch zusätzliche Parameter benötigt. Im Kapitel 3.1.5 konnte das eindimensionale Energieprofil direkt aus der Metadynamiksimulation erhalten werden. Sollte eine Konvergenz dieser Simulation erreicht worden sein, müsste die Energiefläche vollständig beschrieben und keine signifikante Änderung erkennbar sein. Die Auftragung des eindimensionalen Energieprofils in definierten Zeitinkrementen stellt eine ergänzende Möglichkeit für die Beurteilung der Konvergenz einer Metadynamik dar.

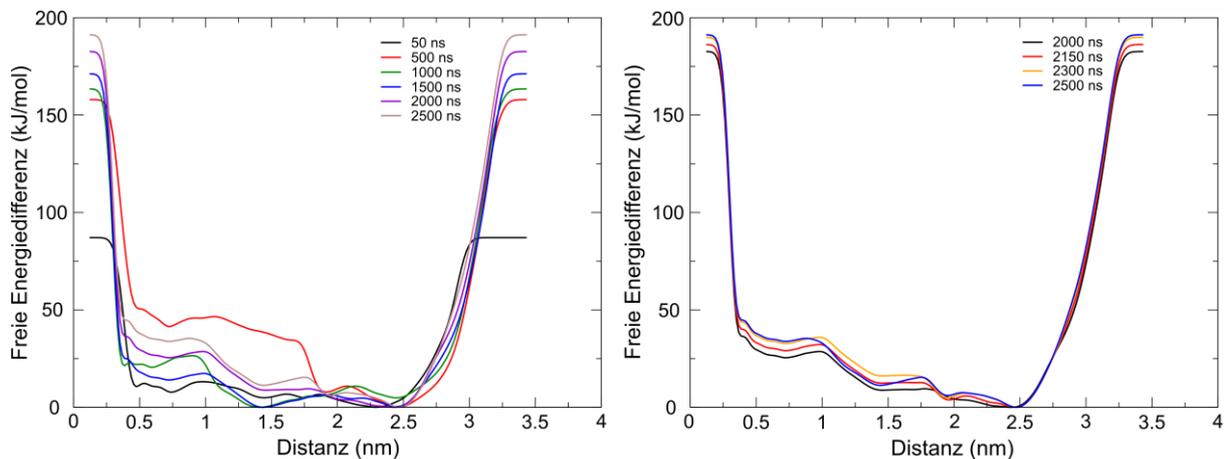


Abbildung 39: Entwicklung der eindimensionalen Energiefläche des Scharnier-Peptids (W-W'-Abstand) während der Metadynamik-Simulation in definierten Zeitabständen. Links: Die Darstellung des Energieprofils über den gesamten Simulationsverlauf (2500 ns) demonstriert eine deutliche Veränderung des Verlaufs in den ersten 2000 ns. Rechts: Die detaillierte Auftrennung der letzten 500 ns der Simulation zeigt die geringe Differenz der Energiekurven zueinander, was auf eine Konvergenz der Metadynamik hindeutet.

Die Entwicklung des Energieprofils (Abbildung 39) demonstriert, dass die Metadynamik-Simulation neue Bereiche des konformationellen Raums erkundet, da sich in den ersten 1000 ns die Form des Verlaufs signifikant verändert. Dieser Trend wird bis 2000 ns fortgesetzt, wobei das Ausmaß der Veränderung immer geringer wird. Allein die detaillierte Betrachtung der letzten 500 ns enthüllt, dass die Energiefläche nur minimale Änderungen durchläuft, was als Kriterium für die Konvergenz der Metadynamik angenommen werden kann. Das Beeinflussen der kollektiven Variable besitzt einen signifikanten Einfluss auf den gesamten konformationellen Bereich des dimeren Tetradisulfids

(Abbildung 36). Sollte die Metadynamik konvergiert sein, müsste ihr Einfluss auf die zweidimensionale Energiefläche ebenfalls minimiert werden. Die Analyse der Energieprofilentwicklung sollte demnach auch auf die zweidimensionale Energiefläche (Abbildung 40) angewandt werden. Durch die zusätzliche Dimension wird der Einfluss der Metadynamik auf den konformationellen Raum des Scharnier-Peptids deutlich. Nach den ersten 500 ns, wurden nur zwei sehr schmale Bereiche von 60° und 2.0 nm, sowie $80-120^\circ$ und 2.0-2.5 nm simuliert. Zwar konnte innerhalb von weiteren 500 ns ein dritter Bereich energetisch erschlossen werden, jedoch erst die erneute Verdopplung der Simulationszeit führt zu einer Energiefläche, die im weiteren Verlauf nahezu unverändert blieb. Um feststellen zu können, ob das Scharnier-Peptid den konformationellen Raum auch ohne den Einfluss des hohen Gaußpotentials zu Beginn abdecken kann, wurde eine Energiefläche erstellt, die die ersten 500 ns der Metadynamik vernachlässigt. Die Gegenüberstellung beider endgültigen Energieprofile demonstriert, dass das dimere Tetradisulfid während der Simulation vorherige Minima, aus denen es nur mit einem hohen Gaußpotential entkommen konnte, erneut aufsucht. Das Zusammenspiel sämtlicher in diesem Kapitel beschriebener Parameter liefert ausreichend übereinstimmende Anhaltspunkte. Daher kann geschlussfolgert werden, dass die Metadynamik des Scharnier-Peptids mit dem W-W'-Abstand als kollektive Variable nach 2550 ns konvergierte.

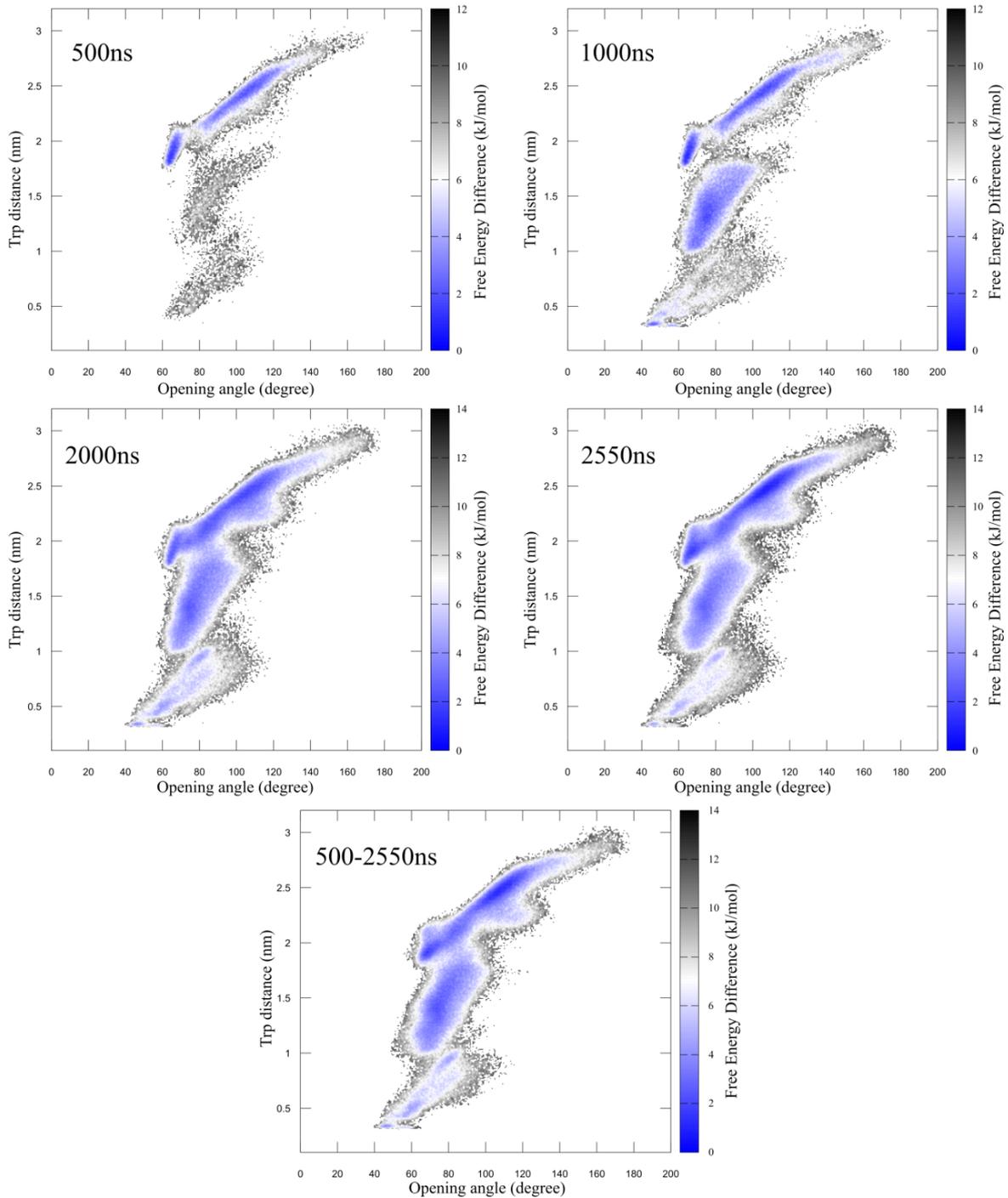


Abbildung 40: Zeitabhängige Entwicklung der zweidimensionalen Energiefläche des Scharnier-Peptids während der Metadynamik-Simulation.^[403] Die ersten vier Plots (Öffnungswinkel gegen W-W'-Distanz in Kombination mit der freien Energiedifferenz) wurden nach den angegebenen Zeitabständen erstellt und demonstrieren, dass in den letzten 50 ns der Simulation keine signifikante Änderung der Energiefläche erfolgt. Die unterste Auftragung vernachlässigt gezielt die ersten 50 ns der Simulation, um abzuschätzen, ob das dimere Tetradisulfid ohne den Einfluss eines hohen Gaußpotentials den konformationellen Raum effektiv erkunden kann.

3.1.7 Alternative kollektive Variablen

Sämtliche Schlussfolgerungen zur intrinsischen Dynamik des dimeren Tetradisulfids, die durch *enhanced sampling* mit Metadynamik formuliert wurden, verwendeten den Tryptophan-Tryptophan'-Abstand als kollektive Variable. Zwar wurde diese Reaktionskoordinate durch Hauptkomponentenanalyse identifiziert, dennoch kann die Existenz von zusätzlichen langsamen Bewegungen die Form der Energiehyperfläche verfälschen. Um diese Einflussnahme evaluieren zu können, soll im Folgenden die Metadynamik mit weiteren kollektiven Variablen wiederholt werden. In der PCA wurde als zweiter Eigenvektor, mit einer Varianz von 11%, das Öffnen und Schließen des Scharnier-Peptids identifiziert und ist zugleich die erste alternative kollektive Variable, die verwendet wurde. Die freie Energiefläche in Abbildung 41 zeigt hierbei eindrücklich, dass zwar ein ausgedehnter Öffnungswinkelbereich von 20-180° im Vergleich zur W-W'-Metadynamik (40-170°) erreicht, der Verdrillungswert jedoch auf 1.6-2.7 nm zusammengedrückt wurde. Auf diese Weise wurde ein Energieprofil erhalten, das, neben einem kleinen Bereich (160° und 2.5 nm), nur ein großes Minimum besitzt. Dieses Ergebnis wurde erwartet, da durch den Öffnungswinkel ausschließlich der zweite Eigenvektor beeinflusst wurde, der einen geringeren Teil der Fluktuationen des Gesamtsystems einnimmt. In den Richtlinien, die BARDUCCI *et al.*^[370] für die Durchführung einer erfolgreichen Metadynamik formulierten, wird die Notwendigkeit, sämtliche langsamen Prozesse oder Bewegungen, die für den untersuchten Vorgang von Bedeutung sind, zu inkludieren, hervorgehoben. Der nächste logische Schritt ist daher eine Metadynamik mit der Kombination aus Öffnungswinkel und W-W'-Abstand als kollektive Variablen. Dies führte jedoch zu einigen Komplikationen. So wurde durch die Verwendung beider Variablen eine Entfaltung einzelner Sekundärstrukturelemente beobachtet. Daher wurde der *biasfactor* und die Höhe des Gaußpotentials reduziert, um den Erhalt der Tertiärstruktur zu gewährleisten. Eine weitere Möglichkeit wäre die Einführung von *restraints* bestimmter Rückgratotope während der Metadynamiksimulation, die jedoch Auswirkungen auf die eigentliche Flexibilität des Scharnier-Peptid hätten und das Ergebnis verfälschen könnten. Daher erfolgte die Metadynamik beider kollektiver Variablen mit reduzierten Parametern. Die so erhaltene freie Energiefläche zeigt eine große Ähnlichkeit mit dem Energieprofil aus Abbildung 36. Zwar werden die gleichen Bereiche erkundet, jedoch ist das Energieprofil der Kombination beider kollektiven Variablen (Abbildung 41) signifikant diffuser. Zudem wurde ein neuartiger, energetisch ungünstiger Bereich bei 20-30° und 1.4-1.6 nm erschlossen. Hierbei könnte es sich um einen Cluster an Konformationen handeln, der einen bedeutenden Teil zur Verbreiterung der Signale im NMR-Spektrum beiträgt. Die Visualisierung dieser energetisch ungünstigen Strukturen enthüllte, dass eine Teilentfaltung der Tertiärstruktur erfolgt ist, die dem System ermöglicht, einen geringeren Öffnungswinkel zu erreichen. Somit war die Verringerung der Metadynamikparameter nicht ausreichend, um die Strukturelemente zu stabilisieren. Von der Durchführung der Metadynamik mit zusätzlich reduzierten Parametern wurde abgesehen, da eine zu starke Absenkung zur Ineffizienz des *samplings* führte. Selbst die verwendeten Parameter, die zur Entfaltung eines β -*hairpins* führten, waren nicht in der Lage, die Minima aus der W-W'-Metadynamik

effektiv abzudecken. Zwar würde eine zusätzliche Verminderung den Verlust der Tertiärstruktur verhindern, jedoch müssten deutlich längere Simulationszeiten verwendet werden. Die Gegenüberstellung der Metadynamiken mit unterschiedlichen kollektiven Variablen wirft zuletzt die Frage auf, warum der konformationelle Raum des Scharnier-Peptids alleinig durch den W-W'-Abstand so effektiv abgedeckt werden konnte. Da nach der Hauptkomponentenanalyse nicht der direkte Eigenvektor, sondern eine Transkription aus einfachen geometrischen Variablen verwendet wurde, könnten bei dieser Betrachtung zusätzliche Fluktuationen mit beeinflusst worden sein. Die Distanz der Indole zueinander spiegelt nicht nur die entsprechende Verdrillung wider, sondern beeinflusst auch gleichzeitig den Öffnungswinkel des Scharnier-Peptids. Daher ist die Beeinflussung des konformationellen Bereichs durch diesen Abstand so effektiv. Die Kombination beider Variablen führt zu einem Ungleichgewicht, da Teile des gleichen Vektors mehrfach beeinflusst würden, was in der Entfaltung der Tertiärstruktur resultiert.

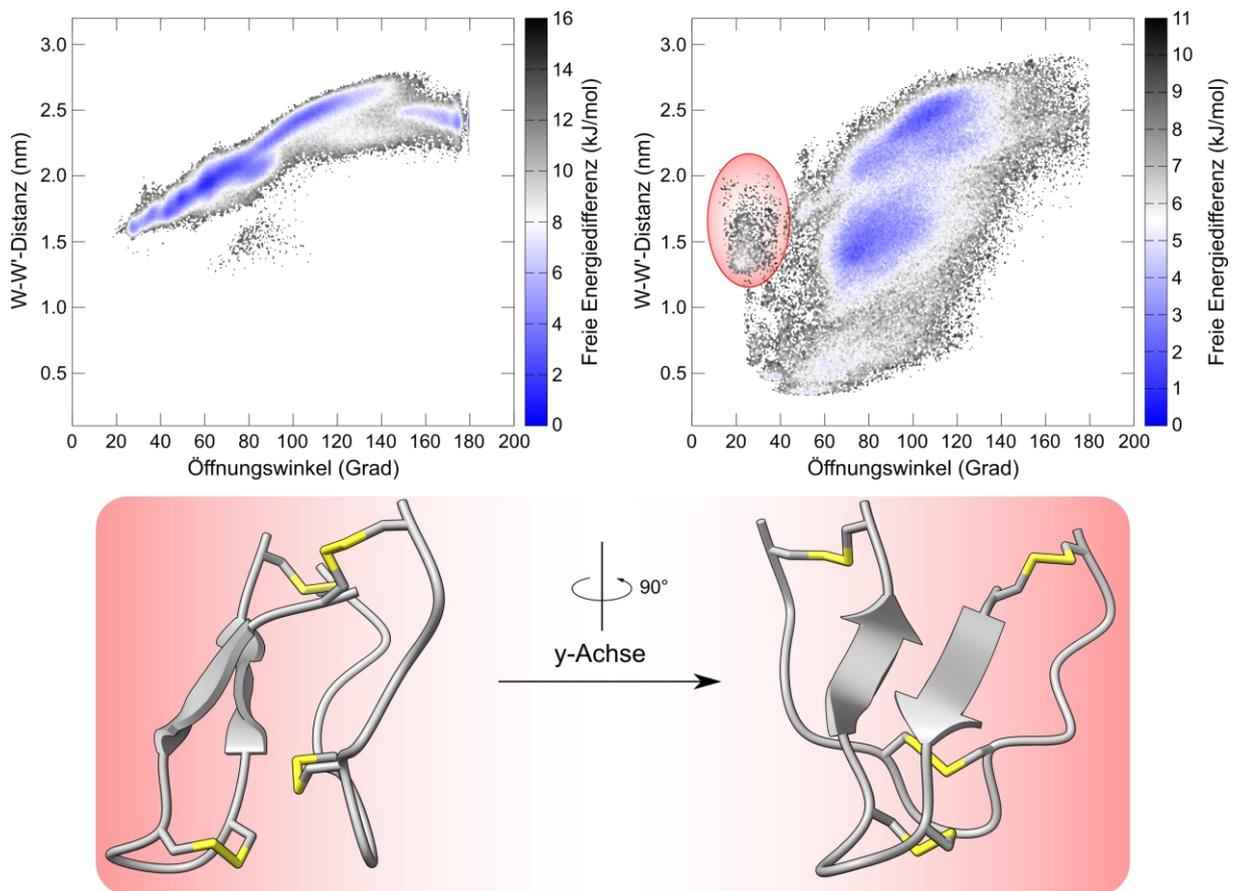


Abbildung 41: Vergleich alternativer kollektiver Variablen, die während der Metdynamik des Scharnier-Peptids verwendet wurden. Links oben: Plot der freien Energiefläche, bestehend aus Öffnungswinkel und W-W'-Abstand, die aus einer Metadynamik mit dem Öffnungswinkel als kollektive Variable gewonnen wurde. Zu erkennen ist der signifikant schmalere Bereich des Minimums, wobei Verdrillungswerte von <1.5 nm nicht erkundet werden. Rechts oben: Darstellung der freien Energiefläche, die nach abgeschlossener Metadynamik erhalten wurde, wobei während dieser Simulation sowohl der Öffnungswinkel als auch die Verdrillung beeinflusst wurden. Unten: Darstellung einer Beispielstruktur des rot-markierten Bereichs aus der Energiefläche rechts oben.

3.1.8 Beeinflussung der Beweglichkeit von Scharnier-Peptiden

Um das Verständnis der Dynamik von scharnierartigen disulfidreichen Peptiden weiterzuentwickeln, sollte der Einfluss von Modifikationen der Struktur auf die Beweglichkeit untersucht werden. Zwar steuern Disulfidbrücken einen erheblichen Teil zur Stabilität der Faltung bei, jedoch erfolgt dabei gleichzeitig eine Restriktion von Freiheitsgraden. Die Entfernung der intramolekularen Disulfide bietet somit eine erste mögliche Position zur Modifikation, um die Dynamik des Scharnier-Peptids zu variieren. Als alternative Aminosäure wurde Serin gewählt, da die Hydroxylgruppe das nächste Analogon zum Cystein darstellt. Da in dem makroskopischen Bild eines Scharniers der zentrale Bolzen ausschlaggebend für die Integrität des Bauteils ist, sollten im atomaren Modell Änderungen am Disulfidcluster, beziehungsweise in dessen Nachbarschaft vorgenommen werden. Eine Erweiterung des Peptids liegt Nahe und daher wurde die Sequenz um ein Tyrosin elongiert. Um den Stabilitätseinfluss beider Modifikationen zu charakterisieren, wurden zunächst die entsprechenden Strukturmodelle analog zu Kapitel 3.1.1 generiert, wobei die NOE-restraints des nativen Scharnier-Peptids verwendet wurden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollen die modifizierten Scharnierpeptide mit SPV-1 (Substitution des internen Disulfids durch Serine) und SPV-2 (Verlängerung der Sequenz durch Tyrosin) abgekürzt werden.

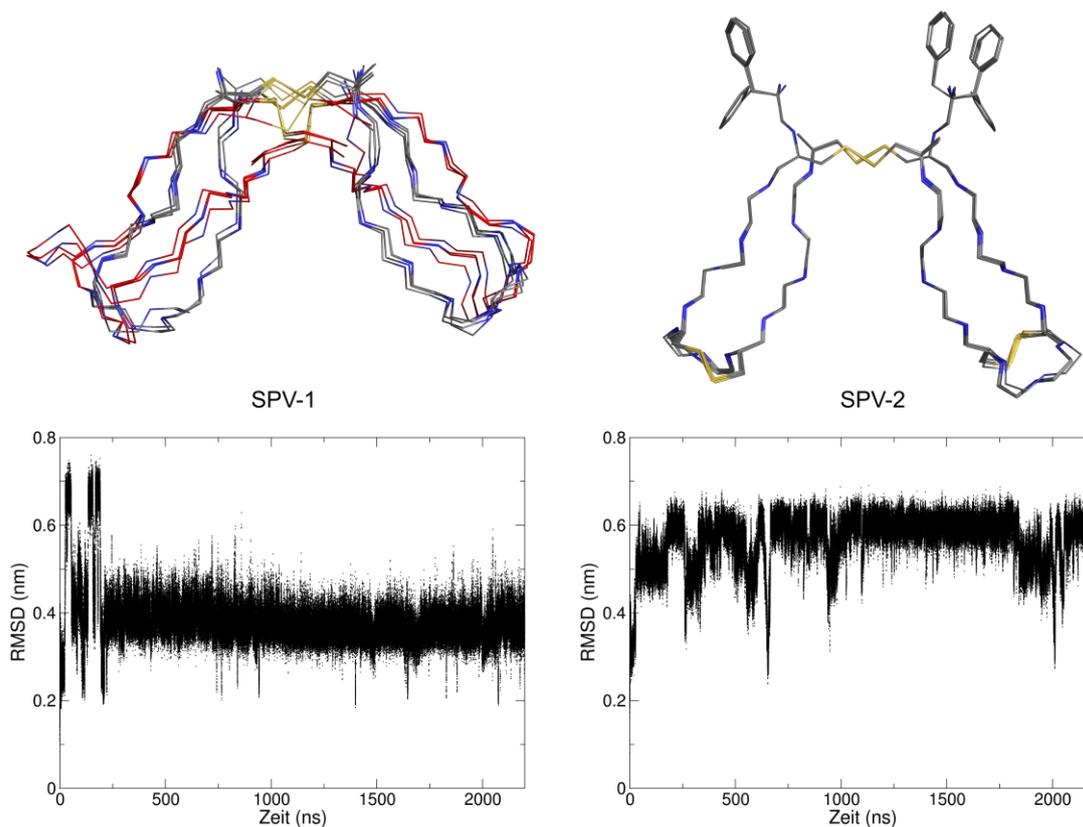


Abbildung 42: NMR-Strukturensemble von SPV-1 (oben links) und SPV-2 (oben rechts). Zu erkennen ist die geringere Varianz in den Strukturen des durch Tyrosin verlängerten Scharnier-Peptids (SPV-2). Die Substitution der internen Disulfide durch Serin erhöht die Flexibilität der β -hairpins, wodurch eine höhere Heterogenität im Strukturensemble erhalten wird. Im Kontrast stehen dazu die RMSD-Verläufe, da SPV-1 (unten links) nach kurzer Equilibrierungsphase einen stabilen niedrigeren RMSD-Wert erreicht, während SPV-2 (unten rechts) eine höhere Frequenz an Übergängen aufzeigt.

Nach Substitution des internen Disulfids (C^5/C^8) durch Serine (S^5/S^8), konnte eine größere Fluktuation im NMR-Strukturensemble beobachtet werden (Abbildung 42). Dieses Verhalten war zu erwarten, da das in der Ausgangsstruktur vorhandene Disulfid bestimmte Freiheitsgrade entfernt und somit die Anzahl der energetisch günstigen Konformere einschränkt. Die Modifikation des Disulfidclusters durch Elongation der Sequenz um ein Tyrosin zeigt wiederum einen geringeren Einfluss auf die Qualität des Strukturensembles. Zwar konnten Konformere mit verschiedener Ausrichtung der Tyrosine beziehungsweise Tryptophane beobachtet werden, jedoch ist die Tertiärstruktur konsistent und zeigt die charakteristische Ausbildung des antiparallelen β -Faltblatts, das aufgrund des intramolekularen Disulfids in der β -turn-Region stark restriktiert ist. Zudem besitzen alle Derivate eine nahezu identische Verdrillung der β -hairpins zueinander, was aufgrund der gleichen NOE-restraints erwartet wurde. Ausgehend von den NMR-Strukturen wurden erneut MD-Simulationen durchgeführt, um das dynamische Verhalten der Scharnier-Peptid-Derivate genauer zu untersuchen. Überraschenderweise führte die Substitution der intramolekularen Disulfidbindungen durch Serine (SPV-1), nicht zu einer höheren Fluktuation der RMSD, wie sie in den NMR-Berechnungen beobachtet wurde, sondern zu einer raschen Konvergenz nach kurzer Equilibrierungsphase. Im Kontrast dazu zeigt das SPV-2 auch nach 1 μ s Simulationszeit häufige Übergänge und erreicht insgesamt einen deutlich höheren RMSD von 0.6 nm. Zwar können aus der Betrachtung dieses einzelnen Parameters noch keine vollständigen Schlussfolgerungen gezogen werden, jedoch enthüllt selbst die klassische Moleküldynamik-Simulation, dass die Substitution in der Nähe des Disulfidclusters einen signifikanteren Einfluss auf die Dynamik des Scharnier-Peptids ausübt als die Entfernung der internen Disulfidbrücken. Ein möglicher Grund könnte die sterische Hinderung der Tyrosin-Seitenketten sein, die durch Wechselwirkungen die Integrität des Disulfidclusters verringern.

Dem Analyseverlauf des nativen Scharnier-Peptids folgend, erfolgte nun für SPV-1 und SPV-2 die Hauptkomponentenanalyse der Trajektorie, die aus der MD-Simulation erhalten wurde (Abbildung 43). Auch hier konnten zwei Eigenvektoren identifiziert werden, die den Großteil der Gesamtfluktuationen des Systems beschreiben. Die Visualisierung dieser Vektoren durch Projektion auf die Trajektorie enthüllte zudem, dass die gleichen Bewegungen (Verdrillung der β -hairpins und Öffnungs- und Schließmechanismen) den entsprechenden Eigenvektoren zugeordnet werden konnten. Jedoch wurde eine Verschiebung der Verhältnisse beobachtet. SPV-1 zeigte eine signifikante Zunahme des zweiten Eigenvektors (Öffnen und Schließen) auf 21%, bei gleichzeitigem Beibehalten der Verdrillung von 52%. Durch die Entfernung der Disulfidbrücke wird die Beweglichkeit des β -hairpins erhöht, wodurch zusätzliche lokale Fluktuationen auftreten können. Die Verlängerung der Kette durch Tyrosin reduzierte den Einfluss der Öffnungs- und Schließbewegung auf 9%, wobei der Anteil der Verdrehung minimal auf 57% anstieg. Obwohl die Differenz klein ist, kann dies ein Hinweis auf die Verschiebung der Konformation in einen geöffneteren Zustand sein. Eine mögliche Erklärung liegt hierbei erneut in der sterischen Abstoßung der Tyrosine, die bei einer geschlossenen Konformation sich annähern und

dadurch in sterisch ungünstigen Kontakt kommen, was zu einer energetischen Erhöhung dieses Zustands resultieren würde.

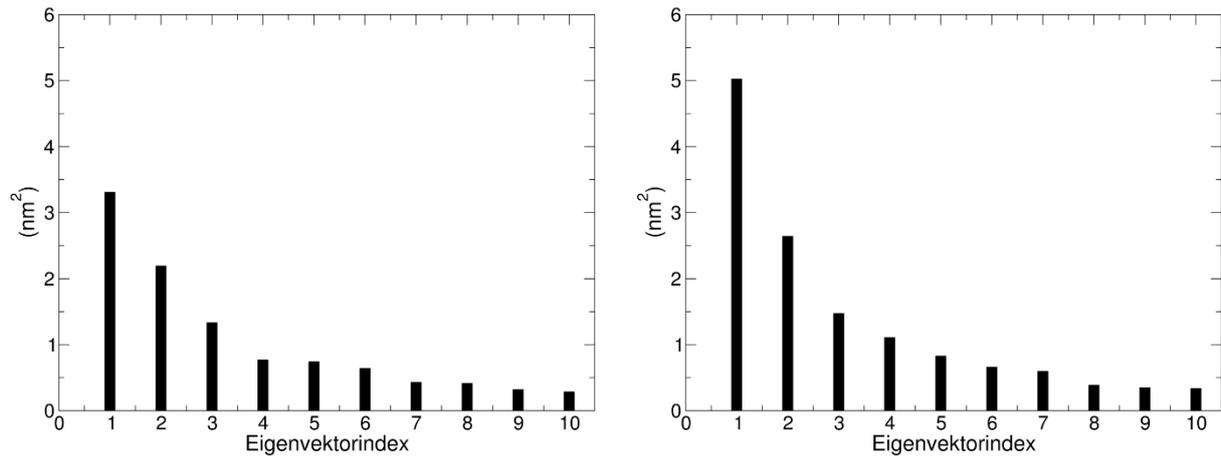


Abbildung 43: Scree-Plot der Scharnier-Peptid-Derivate SPV-1 (links) und SPV-2 (rechts) zur Darstellung der Hauptkomponentenanalyse. In Übereinstimmung mit bisherigen Erkenntnissen, führte die Entfernung der internen Disulfidbrücke zur erhöhten Flexibilität der β -hairpins, wodurch die Varianz des ersten Eigenvektors im Verhältnis erniedrigt wurde. Die Verlängerung der Peptidkette durch ein Tyrosin (SPV-2) führte zu einem Scree-Plot, der eine größere Ähnlichkeit mit dem nativen Scharnier-Peptid aufweist.

Wie aus den vorherigen Abschnitten entnommen werden konnte, übt die Elongation der Sequenz durch Tyrosin einen erheblichen Einfluss auf die Dynamik des dimeren Tetradisulfids aus. Um zu überprüfen, ob sich dieser Effekt unmittelbar auf die Stabilität des Disulfidclusters auswirkt, sollte ein neuer Parameter zur Beschreibung ausgewählt werden. Neben der gezielten Beschreibung der Dynamik des Clusters, könnte dadurch auch eine Variable identifiziert werden, die einen Vergleich zu anderen Scharnier-Peptiden ohne β -hairpin-Motiv ermöglicht. Da während der Verdrillung der β -hairpins, sowie dem Öffnen und Schließen des Scharniers, ebenfalls eine Verdrehung des Disulfidclusters auftritt, wurde die Torsion, bestehend aus den Positionen der α -Kohlenstoffatome der Cysteine (C^1 - C^{12} - $C^{12'}$ - $C^{1'}$) selektiert und für alle drei Scharnier-Peptide in Abbildung 44 gegen die Zeit aufgetragen.

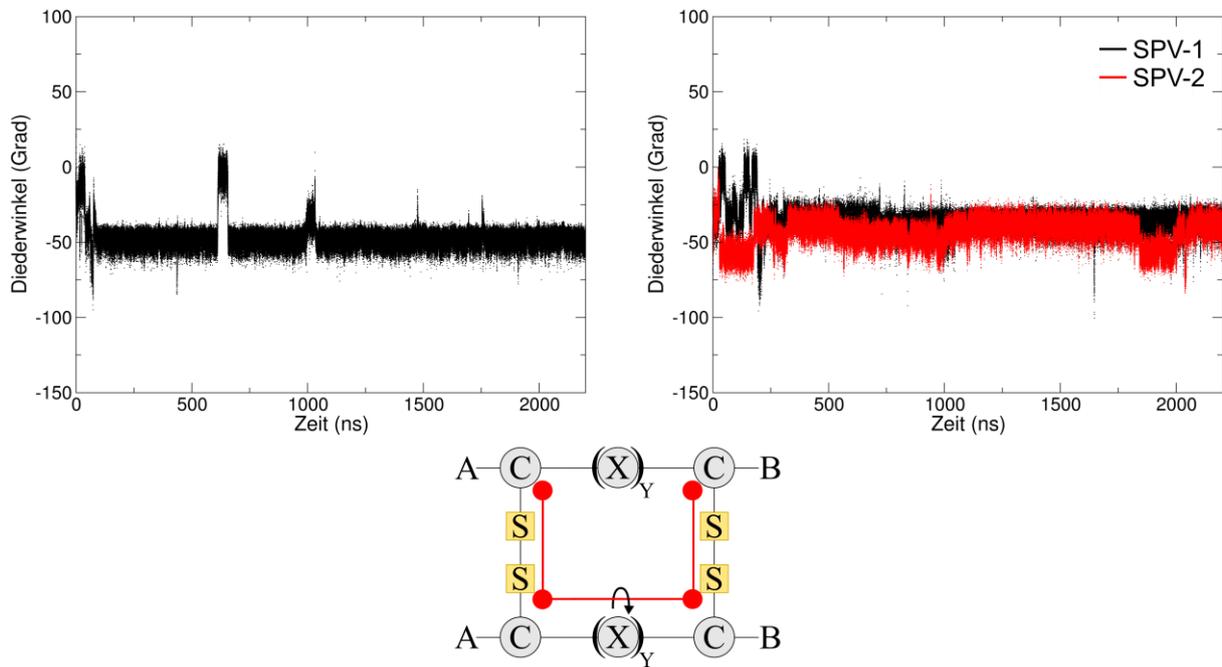


Abbildung 44: Verlauf des Diederwinkels vom Disulfidcluster während der klassischen MD-Simulation des nativen Scharnier-Peptids (links), sowie von SPV-1 und SPV-2 (rechts). Die native Sequenz besitzt eine Verdrillung von ca. -60° , die in den beiden Derivaten auf -50° erniedrigt wird. Der Diederwinkel wurde durch die Positionen der α -Kohlenstoffatome der Cysteine im Disulfidclusters definiert (unten).

Das dimere Tetradisulfid zeigt einen sehr stabilen Disulfidcluster mit einer leichten Verdrehung von -60° , die, während der Equilibrierung des Systems und einer kleinen Fluktuation bei 600 ns kurzzeitig unterbrochen wurde. SPV-1 und SPV-2 zeigen einen ähnlichen Verlauf, jedoch ist die Verdrillung mit -50° ein wenig geringer. Der Vergleich der Parameter hebt zudem erneut das unzureichende *sampling* der klassischen Moleküldynamik-Simulation der Scharnier-Peptid Derivate hervor. Aufgrund der strukturellen Analogie können die kollektiven Variablen der *wt*-Metadynamik des nativen dimeren Tetradisulfids direkt auf die Derivate transferiert werden.

Die adaptive Beeinflussung der β -*hairpin*-Verdrillung spiegelt sich auch in der Flexibilität des Disulfidclusters wider, indem jedes Derivat hochfrequente Übergänge zwischen verschiedenen Torsionen aufzeigt. Abbildung 45 demonstriert, dass der Diederwinkel zwischen -60 und 30° schwankt, wobei für einen begrenzten Zeitraum auch eine parallele Ausrichtung (0°) angenommen wird. Da sämtliche Derivate ein ähnliches Muster aufzeigen, ist die ausschließliche Auswertung der Verläufe wenig aussagekräftig. Erst die Auftragung der Diederwinkel anhand ihrer Häufigkeit in Form eines Histogramms (Abbildung 45), enthüllt den Einfluss der Modifikationen auf die Scharnier-Dynamik.

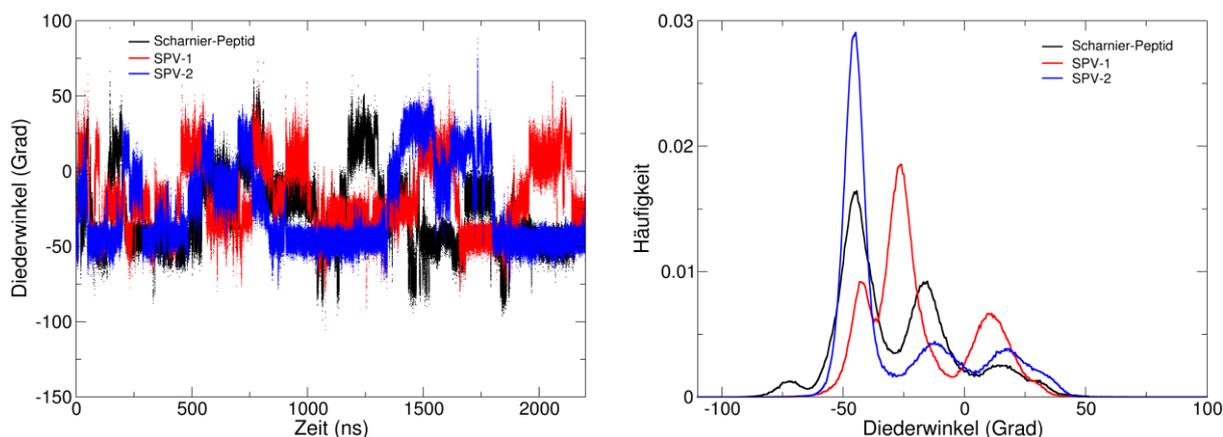


Abbildung 45: Einfluss der *wt*-Metadynamik auf die Verdrillung des Disulfidclusters von verschiedenen Scharnier-Peptiden. Die Torsion zeigt eine rapide Änderung während des Simulationszeitraums, bevorzugt aber eine leicht verdrehte Anordnung (links). Die Auftragung der Winkelverteilung anhand ihrer Häufigkeit enthüllt bevorzugte Konformationen der Scharnier-Peptide (rechts).

Die größte Häufigkeit des nativen Scharnier-Peptids liegt bei -45° , wobei ein weiteres Maximum bei -17° zu erkennen ist. Die Substitution der intramolekularen Disulfidbrücken verändert nicht nur die Position der Maxima, sondern den gesamten Verlauf des Histogramms der Disulfidverdrillung. Zwar ist -45° erneut ein bevorzugter Diederwinkel, jedoch besitzt der größte Anteil der Strukturen während der *wt*-Metadynamik eine Torsion von -25° . Zusätzlich erlaubt die erhöhte Flexibilität der β -hairpins, dass der Scharnierkern einen zuvor energetisch ungünstigen Diederwinkel von 11° einnehmen kann. Die Verlängerung der Peptidsequenz durch ein Tyrosin, führt dagegen zu einer Restriktion der Beweglichkeit des Disulfidclusters, wobei selbst in der *wt*-Metadynamik, fast ausschließlich eine Torsion von -45° eingenommen werden kann. Zwar existieren bei -15 und 15° zwei weitere Maxima, jedoch sind diese im Vergleich zum stark dominierenden Maximum bei -45° vernachlässigbar. Diese Beobachtungen stimmen mit den vorherigen Schlussfolgerungen zur Dynamik der Scharnier-Peptid-Derivate überein. Um ein detaillierteres Bild über den konformationellen Bereich, der den Scharnier-Peptid-Derivaten zur Verfügung steht zu erhalten, wurde in Analogie zum Kapitel 3.1.5 die zweidimensionale freie Energiefläche, definiert durch den Öffnungswinkel und der Verdrillung der β -hairpins erstellt (Abbildung 46).

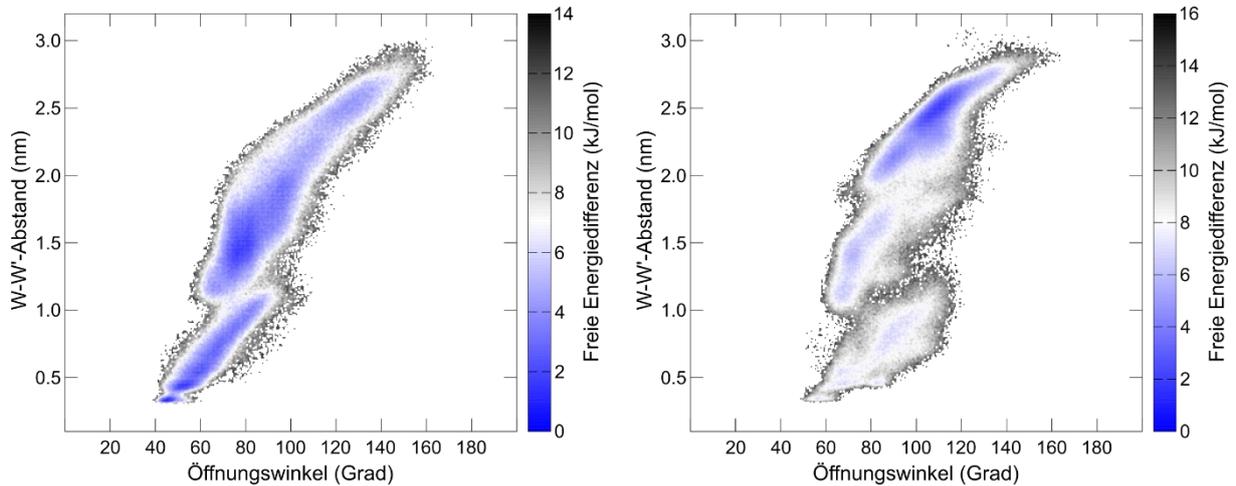


Abbildung 46: Freie Energieflächen der Scharnier-Peptid-Derivate SPV-1 (links) und SPV-2 (rechts), die durch den Öffnungswinkel und den W-W'-Abstand definiert sind. Die Differenz der freien Energie wurde durch eine Neugewichtung der Konformerpopulationen nach der *wt*-Metadynamik erhalten. Austausch der internen Disulfidbrücke durch zwei Serine ermöglicht SPV-1 die geschlossene, parallele Anordnung mit einer geringen Energiebarriere zu erkunden. Die Elongation um ein Tyrosin schränkt das Scharnier auf eine geöffnete und verdrehte Struktur ein.

Zwar ist die Ausdehnung der freien Energiefläche der beiden Scharnier-Peptid-Derivate in beiden Dimensionen vergleichbar mit dem nativen dimeren Tetradisulfid (Abbildung 36), dennoch sind Unterschiede in der energetischen Beurteilung der einzelnen Bereiche zu erkennen. Die Substitution des intramolekularen Disulfids nötigt das Scharnier eine geschlossene Struktur mit einem Winkel von 40-100° und einem W-W'-Abstand von 0,3-2,0 nm anzunehmen. Überraschenderweise stellt nun die Konformationen, mit einer minimalen Verdrillung von 0,3 nm und einem Öffnungswinkel von 43° die energetisch günstigste Anordnung dar. Zusätzlich spiegelt sich der Einfluss der erhöhten Flexibilität der β -hairpins auch in der Anzahl der definierten Bereiche wider. Während das native Scharnier-Peptid drei abgegrenzte konformationelle Regionen besitzt, wurde durch die Entfernung des intramolekularen Disulfids die Energiebarriere des Übergangs bei 80° und 1,8 nm abgesenkt, wodurch zwei definierte Bereiche miteinander verbunden wurden. Die Einführung eines C-terminalen Tyrosins schränkt die Beweglichkeit dieses Scharnier-Peptid-Derivats signifikant ein. Während SPV-1 in beiden Dimensionen die entsprechenden Extremwerte erreicht, ohne eine große Energiebarriere zu überwinden, zeigt SPV-2 eine stark begrenzte energetisch günstige Region von 80-130° und 1,9-2,8 nm. Zwar ist eine große Ähnlichkeit in der Beschaffenheit der freien Energieflächen von SPV-2 und nativen Scharnier-Peptid erkennbar, jedoch sind Konformationen mit einer Kombination aus geringerem Öffnungswinkel und Verdrillung energetisch ungünstig, wodurch diese Regionen nur unregelmäßig erkundet werden. Die Ergebnisse der Analyse der zweidimensionalen Energieflächen zeigen erneut eine exzellente Übereinstimmung zu den bisherigen Erkenntnissen, die aus der Auswertung der eindimensionalen Parameter gewonnen werden konnten.

Da nun eine detaillierte Beschreibung sowohl der Dynamik des nativen dimeren Tetradisulfids als auch der Auswirkungen von Modifikationen im β -hairpin und Disulfidcluster vorliegt, können zukünftige Anwendungen dieses Epitops postuliert werden. SCHRIMPF *et al.* demonstrierten durch ihre

Untersuchungen, dass die 12 Aminosäuren enthaltende Peptidsequenz CHWECRGCLVC selektiv zum entsprechenden dimeren Tetradisulfid oxidiert.^[275] Selbst Modifikationen in der Beladung des Disulfidclusters scheinen die selektive Dimerisierungseffizienz nur marginal zu beeinflussen. Ein weiterer großer Vorteil ist die Kodierbarkeit der Sequenz. Diese Fähigkeit wurde bereits zur Dimerisierung von biologisch relevanten Strukturelementen genutzt.^[398] Im Detail konnten SCHRIMPF *et al.* zeigen, dass sowohl die Scharnier-Region des IgG-Antikörpers als auch das LEH-Protein über das Scharnier-Peptid dimerisiert werden können und weiterhin ihre Aktivität aufrechterhalten.^[415] Daher sollte die Dynamik des Scharnier-Peptids zusätzlich noch in einer Proteinnahen Umgebung betrachtet werden. Da die von Schrimpf *et al.* untersuchten Systeme sehr groß sind, sollte ein Modell entwickelt werden, das eine wichtige Protein-Interaktion nachahmt. Ein mögliches Beispiel wäre hierbei die Dimerisierung des Strukturmotiv eines vier-Helix-Bündels, das in mehreren Proteindomänen (HAMP-Domäne, Ferritin ColE1-ROP-Protein) häufig vorkommt und dessen Dynamik im Folgenden kurz beschrieben werden soll.^[416-418]

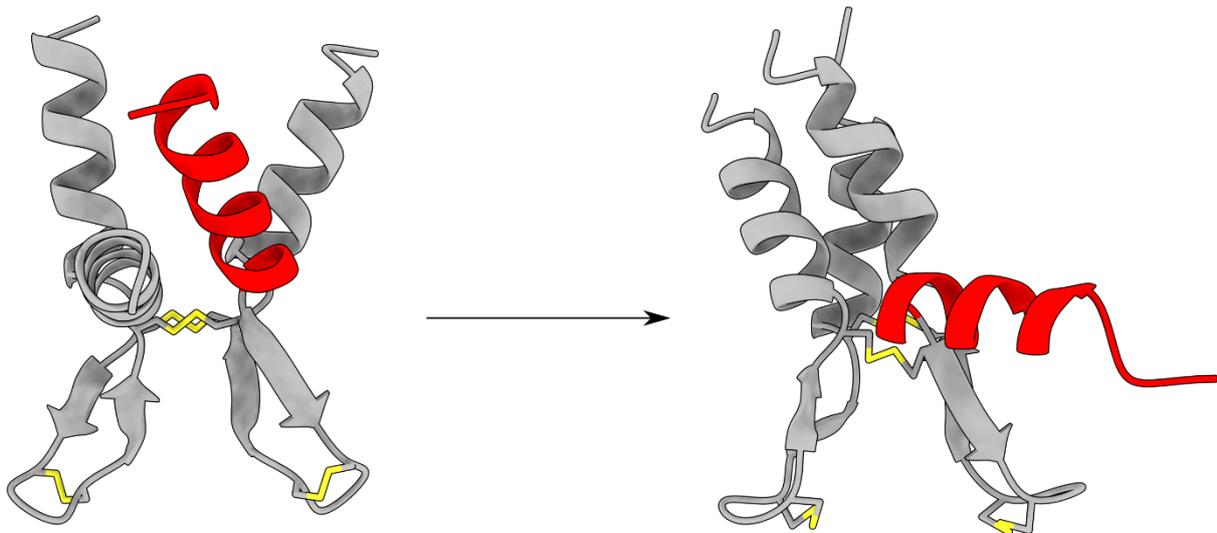


Abbildung 47: Postulierte Struktur eines vier-Helix-Bündels, das durch den von SCHRIMPF *et al.* designten Tetradisulfid dimerisiert wurde und damit eine mögliche Anwendung des Scharnier-Peptids darstellt. Links: Der NMR-Strukturvorschlag, basierend auf NOE-*restraints* des nativen Scharnier-Peptids, zeigt die Anordnung der vier Helices zueinander. Nach einer kurzen MD-Simulation wird eine Helix verdrängt, wodurch ein dicht gepacktes drei-Helix-Bündel gebildet wird.

Die in den vorherigen Kapiteln aufgeklärte Dynamik ermöglicht die gezielte Einschränkung der Beweglichkeit verknüpfter Proteinreste, die durch Einfügen von Glycin- oder Oligo-Glycin-Linken zwischen Scharnier und Protein gesteuert werden, kann. Das vier-Helix-Bündel, welches jeweils aus 14 Alaninen besteht, kann entweder parallel oder antiparallel zueinander ausgerichtet sein. Die NMR-Struktur, basierend auf den NOE-*restraints* des nativen Scharnier-Peptids, zeigt zunächst eine symmetrische Anordnung der α -Helices, die in mittlerer Entfernung zueinanderstehen. Nach einer kurzen Simulationsdauer von 300 ns equilibriert die Struktur zu dem in Abbildung 47 gezeigten Konformer. Das Scharnier-Peptid ist in der Lage, die Anordnung dreier α -Helices einzuschränken, verdrängt jedoch die vierte Helix aufgrund sterischer Anforderungen. Diese kollektiven Bewegungen

innerhalb des Bündels könnten Einblicke in den Mechanismus der Signalübertragung von biochemischen Prozessen liefern.^[419] Selbst aus dieser eingeschränkten, ausschließlich theoretischen Betrachtung ist ersichtlich, dass das dimere Tetradisulfid wertvolle Erkenntnisse zur Aufklärung der Dynamik von biologischen Makromolekülen beisteuern kann.

3.1.9 Parallele vs. Antiparallele Scharniere

Die Reduktion des 14mer β -*hairpins* mit vier Cysteinen auf ein 12mer Peptid resultierte nach erfolgreicher Oxidation in der Dimerisierung zum antiparallelen Scharnier-Peptid. Parallel verknüpfte *Hinge*-Regionen besitzen eine größere Bedeutung in biologischen Systemen, was am Beispiel der Immunglobulinen deutlich wird.^[276] Diese Proteine sind essenziell für die Wirkungsweise des körpereigene Immunsystems. Einer der größten Gruppen dieser Antikörper ist der IgG-Isotyp, der eine Y-förmige Struktur aufweist und über Disulfid-verbrückte leichte und schwere Ketten verfügt.^[276] Die Zusammensetzung der zentralen Scharnier-Region, die über ein CXXC-Motiv verfügt sowie die Anzahl der Disulfidbrücken kategorisiert die entsprechenden IgG-Subtypen. Sowohl IgG₁ als auch IgG₄ enthalten mit zwei Disulfiden das Minimum, das für eine erfolgreiche Ausbildung der Scharnier-Region benötigt wird, unterscheiden sich jedoch durch eine Prolin-zu-Serin-Mutation im zentralen Scharnier, was zu dem Motiv CPPC (IgG₁) und CPSC (IgG₄) führt.^[276] Bereits diese einzelne Mutation resultiert in einer deutlich gesteigerten Tendenz der Isoformbildung für IgG₁- und IgG₄-Antikörper.^[276] Die erfolgreiche Entwicklung von monoklonalen Antikörpern beziehungsweise deren Konjugaten für die Behandlung von seltenen Krankheiten benötigt jedoch Scharnier-Regionen, die eine minimale Tendenz zur Isoformbildung durch Disulfidaustausch aufweisen.^[420]

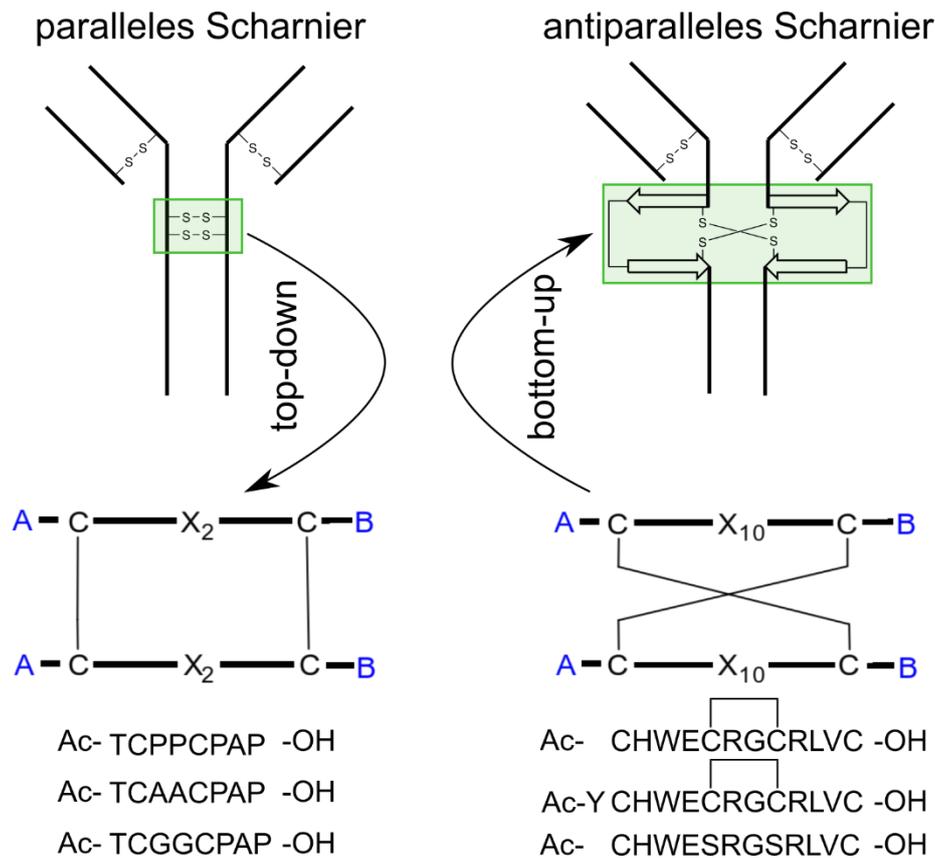


Abbildung 48: Verwendung eines *top-down*-Ansatzes zur Identifizierung der Scharnier-Region und Gewinnung von Erkenntnissen über die Konformationsdynamik. Übertragung dieses Wissens (*bottom-up*) auf ein antiparallel verbundenes Scharnier-Peptid, das in zukünftigen Arbeiten in ein IgG-abgeleiteten Antikörper eingebaut werden könnte, um neuartige Konjugate zu erhalten.

Da die Aktivierungsbarriere für die Isomerisierung von Disulfiden und dadurch die thermodynamische Stabilität in der natürlichen Scharnier-Region erniedrigt ist, stellt die Erhöhung der Faltungstabilität dieses Strukturmerkmals einen idealen Parameter für Optimierungen dar. Um Richtlinien für zukünftige organisch chemische Untersuchungen zu formulieren, sollte die Mobilität dieser Scharniere mit den, in den vorherigen Kapiteln vorgestellten Methoden untersucht und mit dem, von SCHRIMPF *et al.*^[275] entwickelten Scharnier-Peptid verglichen werden. Bereits 1991 untersuchten KESSLER *et al.*^[281] die Dynamik der isolierten Scharnier-Region von IgG₁ mit NMR-Strukturanalyse und Moleküldynamik-Simulationen. In Anlehnung an diese Studien, soll zusätzlich zur Charakterisierung der Dynamik der IgG₁-Scharnier-Region (TCPPCPAP)₂ auch der Einfluss von Mutationen innerhalb der Kern-Region auf die Beweglichkeit untersucht werden. Hierzu wurde die Flexibilität im Disulfidzentrum schrittweise durch die Substitution von P3 und P4 mit Alanin (Ala-IgG) respektive Glycin (Gly-IgG), erniedrigt. Bereits der Vergleich der Strukturensamples, die aus NMR-Berechnungen hervorgehen (Abbildung 49), heben die großen Unterschiede zwischen den einzelnen Peptidsequenzen hervor. Die Prolin-enthaltende Sequenz, die im weiteren Verlauf Pro-IgG bezeichnet wird, zeigt nicht nur die geringste Differenz zwischen den einzelnen Konformeren, sondern nimmt während der MD-Simulation auch den niedrigsten RMSD-Wert von 0.45 nm, mit niederfrequenten Fluktuationen an. Diese Eigenschaft ist nicht auf Ala-IgG und Gly-IgG übertragbar, die innerhalb ihres Strukturensamples signifikante

Unterschiede aufweisen. Diese Differenz kann auf die reduzierte Stabilität des Disulfidzentrums zurückgeführt werden. Interessanterweise zeigt Gly-IgG in den NMR-Strukturen eine geringere Fluktuation als Ala-IgG, trotz der erhöhten Flexibilität der Glycin-Aminosäure. Diese Verhaltensweise ist auch im RMSD-Verlauf zu erkennen, wobei beide Derivate eine hohe Frequenz an Übergängen aufweisen. Die hohe Amplitude indiziert zudem einen erheblichen Konformationswechsel.

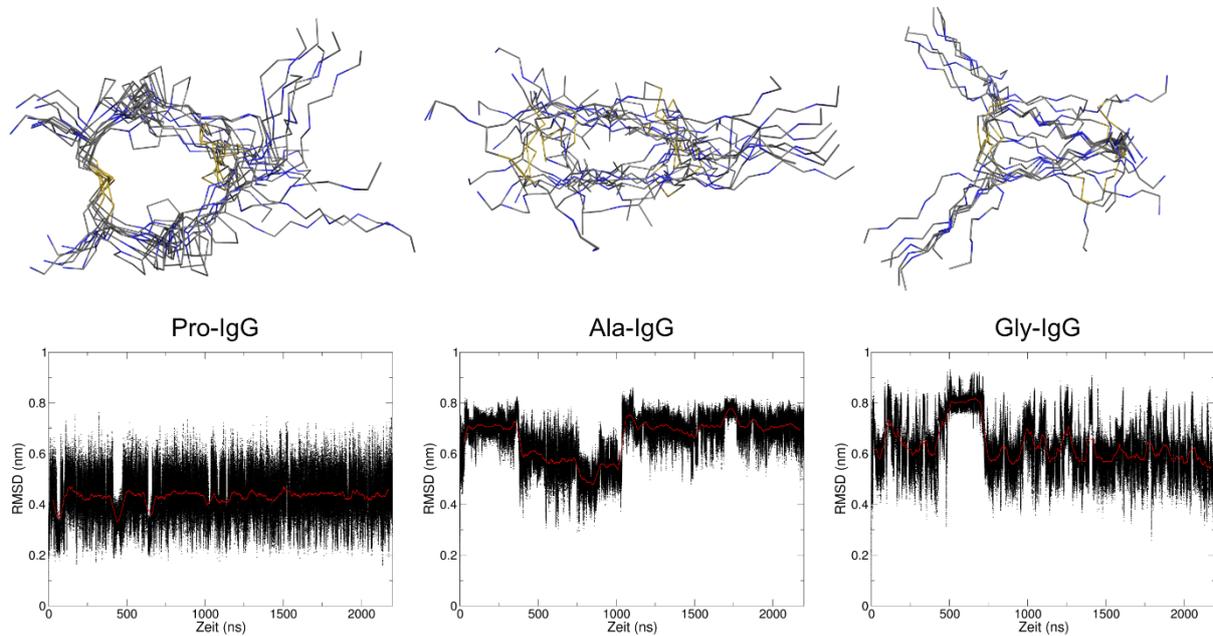


Abbildung 49: NMR-Strukturensembles dreier, der natürlichen Scharnier-Region des IgG₁ nachempfundenen parallel-verknüpfte Disulfidmodellpeptide (oben), mit dem dazugehörigen Verlauf der RMSD (unten), die aus einer klassischen MD-Simulation erhalten wurde. Pro-IgG zeigt einen stabilen Verlauf, ohne starke Fluktuationen mit großer Amplitude, während die Mutation von Pro zu Ala oder Gly die Stabilität der Kernregion verringert.

Die Betrachtung der Trajektorie lässt keine kollektiven Bewegungen erkennen, da diese einen längeren Zeitraum benötigen und durch die große Anzahl an lokalen Fluktuationen überlagert werden. Da die Hauptkomponentenanalyse beim Scharnier-Peptid von SCHRIMPF *et al.*^[275] Fluktuationen mit geringer Amplitude herausfilterte, war eine Anwendung dieser Methode auf die Trajektorie der IgG-Modellpeptide naheliegend. Dadurch konnte das „aneinander Vorbeischwingen“ der längeren Ketten, die nach dem zweiten Disulfid lokalisiert sind, als Haupteigenvektor mit 54% Gesamtvarianz identifiziert werden. Diese Bewegung ist weiterhin im Ala-IgG und Gly-IgG erkennbar, jedoch sind weitere Eigenvektoren, wie das Öffnen und Schließen der Disulfidregion von größerer Bedeutung, da die Stabilität des Disulfidzentrums durch die Mutationen signifikant reduziert wurde. Weiterhin stellte sich die Identifikation von zusätzlichen kollektiven Bewegungen als schwierig heraus, da die erhöhte Flexibilität mehrere konformationelle Änderungen an verschiedenen Positionen im Peptid zuließ. Die Visualisierung der beiden Eigenvektoren mit der größten Varianz erfolgte erneut über die Darstellung der Start- und Endstrukturen der entsprechenden Bewegung mit zusätzlicher Abbildung der Vektoren (Abbildung 50). Um einen detaillierteren Einblick der dynamischen Bewegungen innerhalb der *Hinge*-Region des IgG-Antikörpers zu erhalten, wurden die ersten beiden Hauptkomponenten, neben der Visualisierung als Vektoren, noch gegeneinander aufgetragen. Diese zweidimensionale Darstellung

wurde um die Freie Energiedifferenz (ΔG) erweitert und definiert den konformationellen Raum, den Pro-IgG in der Lage ist, während der MD-Simulation zu erkunden. Dabei wurde Populationsdichte in Kombination mit der BOLTZMANN-Verteilung verwendet. Befinden sich die langen Ketten in einer nahezu parallelen Konformation ($PC1 = 0$) oder sind leicht gegeneinander verdreht, kann ein großer Bereich in der PC2-Dimension abgedeckt werden, da eine geringe Energiebarriere von 5-8 kJ/mol vorliegt. Diese Bewegungen entsprechen der Öffnung und Schließung des Disulfid-Kerns. Ausgehend von dieser Region kann ein Wert von $PC2 = 2$ oder -2 angenommen werden, der einen Übergang von $PC1$ auf -3 , dem „aneinander Vorbeischieben“ der Ketten ermöglicht. Hierdurch werden zwei abgegrenzte Bereiche generiert, zwischen denen ein direkter Übergang energetisch ungünstig ist. Schlussendlich ist bei einer sehr starken Verdrehung der Ketten zueinander ($PC1 = -5$), ein diffuser Bereich zu erkennen, bei dem verschiedene Werte von $PC2$ angenommen werden können.

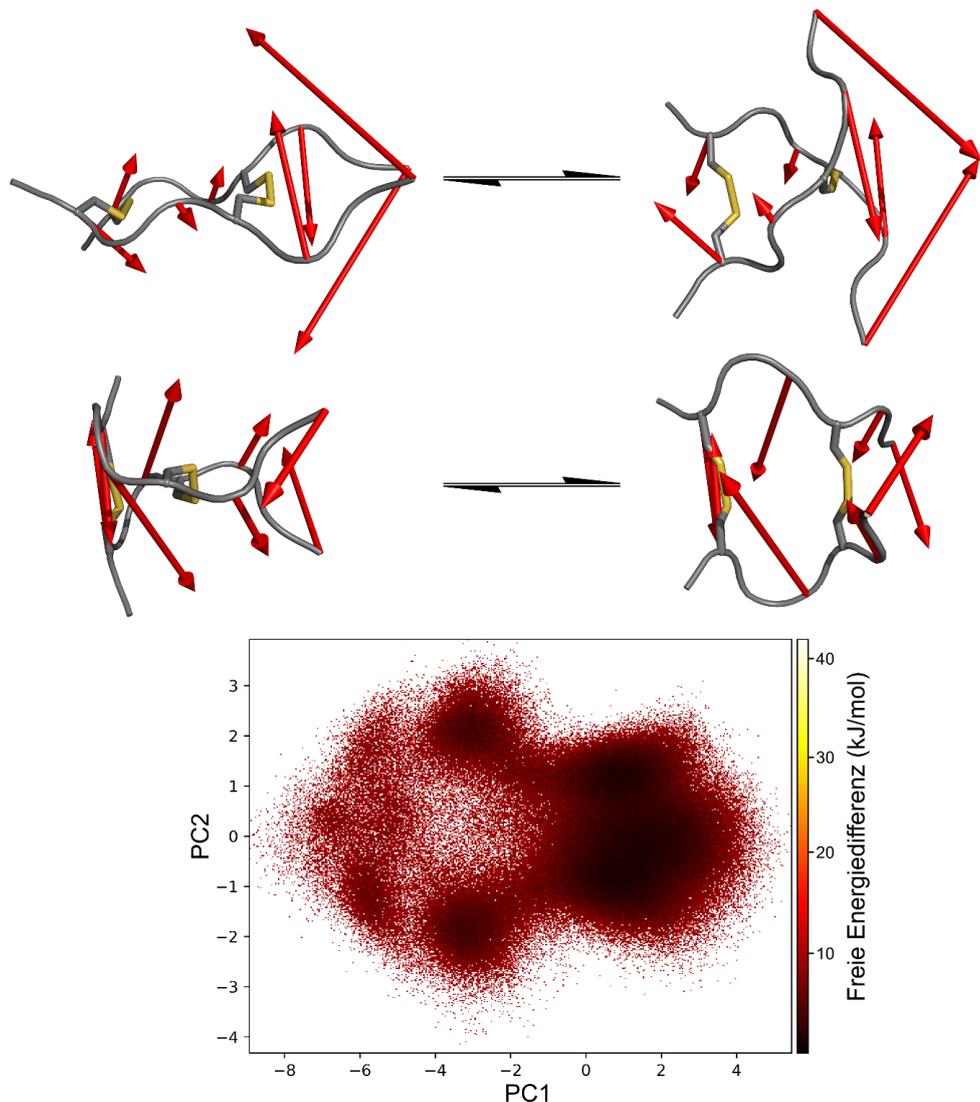


Abbildung 50: Dominierende Eigenvektoren des Pro-IgG, die durch eine PCA enthüllt und anschließend durch rote Pfeile der Start- und Endstrukturen dargestellt wurden. Die entgegengesetzte Translation der C-Termini aus der Peptidebene wird stellt den Eigenvektor mit der größten Varianz dar (oben), während die zweitwichtigste Bewegung als das Öffnen und Schließen der Kernregion identifiziert werden konnte. Der Plot der bersten beiden Hauptkomponenten ($PC1$ und $PC2$) in Kombination mit der Freien Energiedifferenz zueinander enthüllt den konformationellen Raum, der dem Pro-IgG zur Verfügung steht (unten).

Die PCA enthüllte die entgegengesetzte Translation der C-terminalen Peptidketten als Eigenvektor mit der größten Varianz (Abbildung 50). Durch diese Bewegung wird gleichzeitig eine starke Veränderung der Torsionen im Disulfidzentrum durchgeführt. Zwar sind die IgG-Derivate über Disulfid-parallel-verknüpfte Scharnier-Peptide, dennoch ist der, in Kapitel 3.1.8 beschriebene Diederwinkels im Disulfidcluster ein idealer Parameter, um die Dynamik dieser Modell-Peptide zu charakterisieren. Der Vergleich von Pro-IgG mit dem Scharnier-Peptid von SCHRIMPF *et al.*^[275] demonstriert die Ähnlichkeit beider disulfidreicher Dimere, bezogen auf ihre Stabilität (Abbildung 51). Während der gesamten MD-Simulation wurde ein stabiler Wert verzeichnet, der nur kurzzeitig von unregelmäßigen Fluktuationen unterbrochen wurde. Der Vergleich enthüllt zudem, dass Pro-IgG als paralleles Scharnier eine Verdrillung von ca. 0° einnahm, während das antiparallel verknüpfte Scharnier-Peptid einen Wert von -60° bevorzugte. Der stabilisierende Effekt durch die erhöhte Rigidität der Proline innerhalb des Disulfidclusters wurde durch Substitution in Ala-IgG und Gly-IgG entfernt, wodurch der Verlauf des Diederwinkels signifikante Unterschiede aufzeigt. Während beim Pro-IgG eine bevorzugte Torsion identifiziert werden konnte, unterliegt diese beim Ala-IgG und Gly-IgG großen Schwankungen. Diese erreichen teilweise eine Amplitude von 130° und weisen dadurch auf erhebliche konformationelle Änderung in der Struktur hin.

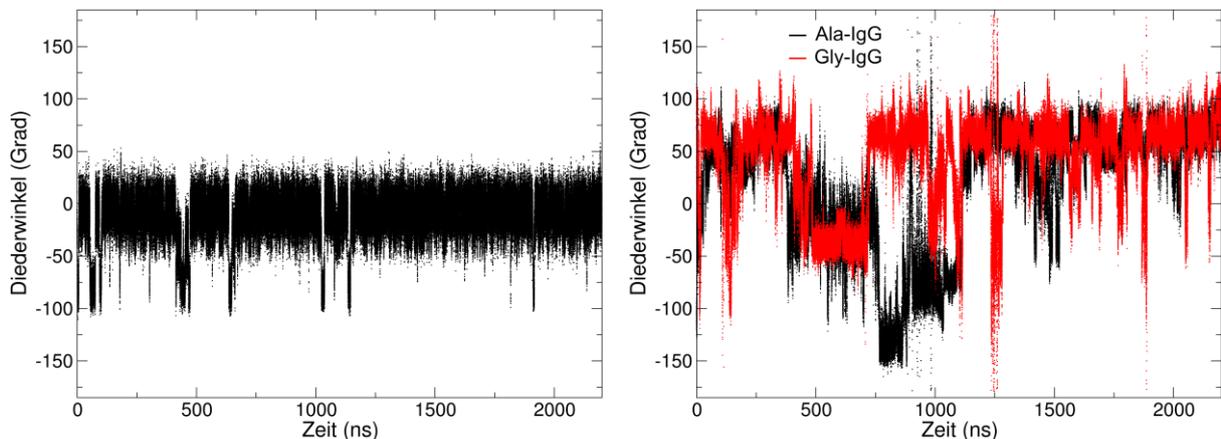


Abbildung 51: Entwicklung der Torsion des Disulfidclusters in IgG-Modellpeptiden, während einer Moleküldynamik-Simulation. Pro-IgG (links) zeigt einen stabilen Verlauf des Diederwinkels, der durch vereinzelte Übergänge unterbrochen wurde. Die Substitution der rigideren Proline durch Alanin oder Glycin (rechts) resultierte in einer erheblichen Erniedrigung der Stabilität des Disulfidzentrums, wodurch der Diederwinkel hochfrequenten Wechsel durchführte.

Der klassische Moleküldynamik-Formalismus enthält, wie in den vorherigen Kapiteln mehrmals beschrieben, Einschränkungen hinsichtlich der Fähigkeit hohe Energiebarrieren effektiv zu kartografieren. Systeme mit einer hohen Stabilität (Pro-IgG und das Scharnier-Peptid nach SCHRIMPF *et al.*^[275]) sind besonders anfällig für eine unzureichende Beschreibung ihrer intrinsischen Dynamik.^[421] Um diese seltenen Ereignisse dennoch statistisch relevant abbilden zu können, wurde erneut die *wt*-Metadynamik, die von PARRINELLO *et al.* entwickelt wurde, angewandt.^[380] Als kollektive Variable wurde der zuvor identifizierte Diederwinkel des Disulfidclusters ausgewählt, die jedoch nur

beim Pro-IgG beeinflusst wurde, da sowohl Ala-IgG als auch Gly-IgG bereits hohe Fluktuationen während der klassischen MD-Simulation zeigten.

Im Vergleich zur equilibrierten Torsion von 0° (Abbildung 51), die während der Moleküldynamik-Simulation erreicht wurde, ändert sich das Verhalten von Pro-IgG innerhalb der *wt*-Metadynamik drastisch. In Analogie zum Verlauf von Ala-IgG und Gly-IgG waren hochfrequente Übergänge mit einer Amplitude von bis 340° in wenigen Nanosekunden zu beobachten, was auf das hohe Gaußpotential von 1.2 kJ/mol zurückzuführen ist (Abbildung 52). Diese größeren Energiewerte waren möglich, da aufgrund der Kürze der Sequenz, im Vergleich zum Scharnier-Peptid, keine definierte Tertiärstruktur vorlag. Durch die Verwendung des Diederwinkels als kollektive Variable, konnte ein freies Energieprofil, direkt aus der Summe der abgelegten Gaußpotenziale gewonnen werden, das zusätzliche Informationen über die konformationelle Flexibilität des Disulfidclusters liefert.

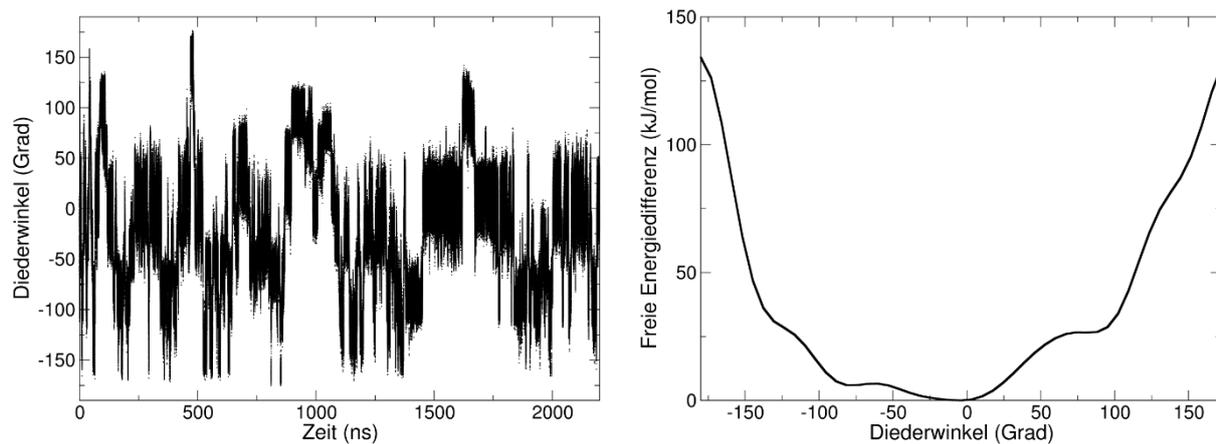


Abbildung 52: Entwicklung des Diederwinkels von Pro-IgG-Modellpeptids während der *wt*-Metadynamik (links). Nach abgeschlossener Simulation konnte das freie Energieprofil aus der Summe der abgelegten GAUßpotenziale erhalten werden und zeigt mehrere Minima, die durch teils niedrige Barrieren voneinander getrennt sind. Das globale Minimum ist bei 0° lokalisiert, was einer parallelen Anordnung der Disulfide entspricht.

Die Torsion der equilibrierten Konformation von 0° , konnte durch das freie Energieprofil als globales Minimum bestätigt werden, wird jedoch von einem weiteren Minimum bei -80° mit einer niedrigen Energiedifferenz von 10 kJ/mol flankiert. Das Pro-IgG ist somit in der Lage, mit einer niedrigen Barriere eine signifikante Konformationsänderung durchzuführen. Dies steht im Kontrast zu der konformationellen Stabilität der *Hinge*-Region des IgG1-Antikörpers, was neben der unterschiedlichen Verknüpfung der Disulfide auch der Größe des Modellpeptids geschuldet ist. Um die lokalen Minima von -125 und 80° zu erreichen, muss das Modell-Peptid jedoch signifikant höhere Energiebarrieren von 20-30 kJ/mol überwinden. Zusammenfassend unterstützen die mittleren bis hohen Energiebarrieren die Schlussfolgerung, dass das CPPC-Motiv zwar eine gewisse Stabilität besitzt, dennoch im Stande ist, eine Scharnier-Dynamik, abhängig von der Zusammensetzung der oberen und unteren Scharnier-Regionen, durchzuführen. Die Gegenüberstellung der Dynamik von parallelen und antiparallelen Scharnier-Peptiden demonstriert die Gemeinsamkeiten in ihrer Beweglichkeit. Dennoch konnte gezeigt werden, dass eine antiparallele Verknüpfung der Scharnier-Region eine geringere Gesamtflexibilität

besitzt und stattdessen gezielte dominierende Bewegungen, wie das Öffnen und Schließen des Scharniers, in Kombination mit der Verdrillung der β -*hairpins* enthält. Modifikationen innerhalb der Scharnier-Region zeigen bei beiden Orientierungen der Disulfide signifikante Auswirkungen auf deren Dynamik. Diese Erkenntnisse könnten für das Design von neuartigen monoklonalen Antikörpern mit einer antiparallel-verknüpften Scharnier-Region genutzt werden, die eine größere thermodynamische Stabilität aufweisen, um dadurch den entropischen Verlust der Gesamtflexibilität kompensieren zu können.

3.2 Charakterisierung der Dynamik des hydrophoben Kerns von Zinkfingerproteinen durch synthetische Modifikationen und computergestützte Simulationen

3.2.1 Einleitung – Das Zinkfingerpeptid als Miniprotein

Miniproteine, wie das im Kapitel 3.1 untersuchte Scharnier-Peptid von SCHRIMPF *et al.*, benötigen wegen ihrer limitierten Sequenzlänge zusätzliche stabilisierende Faktoren.^[63,275] Cysteine besitzen neben der Fähigkeit Disulfide zu bilden auch das Potenzial als Thiolat Metallbindungen einzugehen. Durch diese Vielfältigkeit sind sie in über 90% aller Proteine zu finden.^[422] Eine sehr prominente Proteinfamilie, in der Cystein-Metall-Wechselwirkungen eine essenzielle Rolle für die Struktur und Funktion einnehmen, sind Zinkfinger. Diese aus mehreren Tandemeinheiten von ca. 30 Aminosäuren bestehenden Proteine, werden von über 3% der Gene im menschlichen Genom kodiert, was ihre Bedeutung für biochemische Prozesse hervorhebt.^[46] Eine genauere Betrachtung der Historie und Bedeutung von Zinkfingerproteinen wurde in Kapitel 1.3 dieser Arbeit erörtert. Wie der Name bereits vermuten lässt, koordinieren die Cysteine beziehungsweise eine definierte Anordnung von Cysteinen und Histidinen ein oder mehrere Zink-Atome im Inneren ihrer Struktur. Das Metall ist nicht nur namens- sondern auch strukturgebend, da die Ausbildung der $\beta\beta\alpha$ -Tertiärstruktur des klassischen Cys₂His₂-Zinkfingermotivs nur in Gegenwart eines Metallatoms möglich ist.^[124] Es wäre jedoch anmaßend sich ausschließlich auf die Anwesenheit der metallbindenden Aminosäuren als einziges stabilisierendes Strukturmerkmal zu fokussieren, da Zinkfingerpeptide einen wohl definierten hydrophoben Kern besitzen. Dieser besteht üblicherweise aus einer aromatischen Aminosäure (Phenylalanin oder Tyrosin) und einer aliphatischen Seitenkette, wie Leucin oder Isoleucin (Abbildung 53).

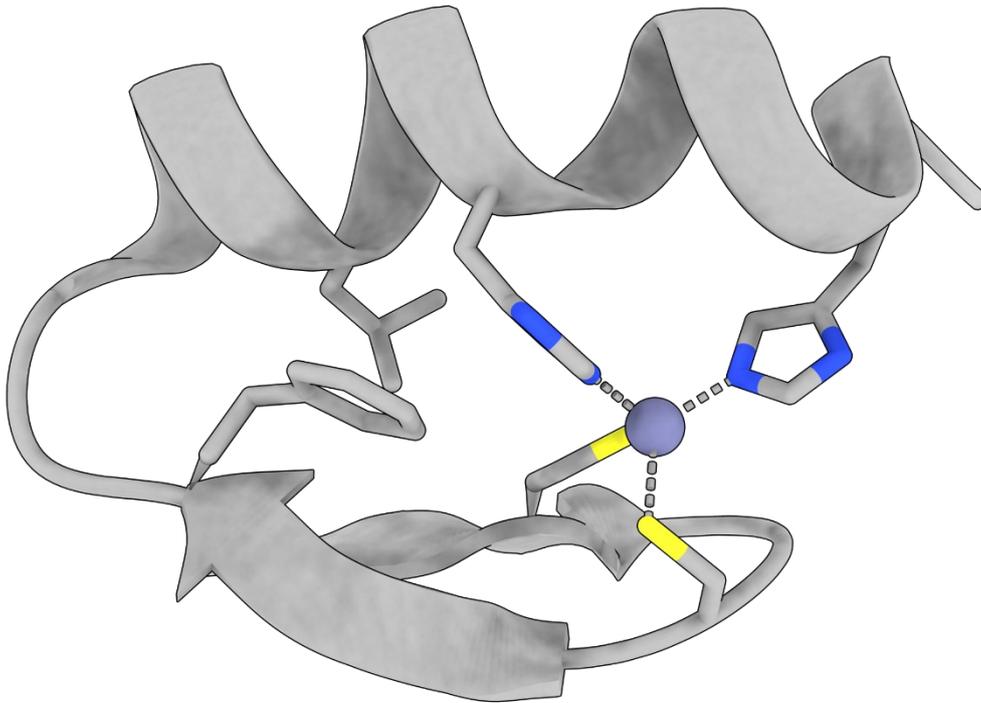


Abbildung 53: Dreidimensionale Struktur (PDB: 1ZNF) einer isolierten DNA-Bindungsdomäne des Xfin-31-Proteins, bestimmt mit Hilfe von NMR-Spektroskopie von WRIGHT *et al.*^[101] Die Darstellung des Peptidrückgrats erfolgte schematisch, während sowohl die Seitenketten der metallbindenden Aminosäuren Cystein und Histidin als auch die Aminosäuren des hydrophoben Kerns, bestehend aus Phenylalanin und Leucin explizit abgebildet wurden.

Neben der Bestimmung isolierter Zinkfingerpeptide, konnten Tandemsequenzen in Gegenwart von DNA-Segmenten kristallisiert werden, wodurch eine detaillierte Analyse der DNA-Interaktionen bestimmter Seitenketten ermöglicht wurde.^[250] Kristallstrukturanalyse ist jedoch nur bedingt geeignet, um dynamische Prozesse innerhalb von Proteinen oder Peptiden zu beschreiben.^[423] Das Strukturmerkmal des hydrophoben Kerns führt häufig zu einer eingeschränkten Mobilität der involvierten Aminosäuren.^[424] Im Kontrast dazu identifizierte zweidimensionale NMR-Spektroskopie ein AA'BB'C-Spin-System für das im hydrophoben Kern eingeschlossene Phenylalanin¹⁰, was auf einen schnellen konformationellen Austausch durch eine Rotation um χ_2 zurückgeführt werden konnte.^[101] Um detaillierte Informationen über die Frequenz dieser Rotation sowie der allgemeinen Flexibilität des Peptidrückgrats und der Seitenketten zu gewinnen, führten WRIGHT *et al.* Relaxationsmessungen durch.^[225,227] Es konnten große Ordnungsparameter für Phe¹⁰ beobachtet werden, was auf eine langsame Rotation hindeutet, die jedoch schneller als die chemische Verschiebungsänderung sein muss.^[227] Um die Bedeutung des zentralen Phenylalanins für die Faltung der Tertiärstruktur charakterisieren zu können, führten sowohl WRIGHT *et al.* als auch WEISS *et al.* Mutationsexperimente im hydrophoben Kern durch.^[425,426] Die Substitution der aromatischen Seitenketten durch eine F10G Mutation resultierte im Unvermögen eine stabile $\beta\alpha$ -Faltung zu erzeugen.^[425] Im Kontrast dazu, ist die Zinkfingermutante F10L in der Lage das entsprechende Faltungsmotiv einzugehen, jedoch konnte eine drastische thermodynamische Destabilisierung beobachtet werden.^[156] WEISS *et al.* legten ihren Fokus auf die Mutation mit einer aromatischen Aminosäure, dem Tyrosin.^[426] Entgegen den Erwartungen ist

die Art der aromatischen Seitenkette im hydrophoben Kern von großer Bedeutung, da im *wild-type* das Phenylalanin ein *edge-to-face*-Stacking mit dem Imidazol des N-terminalen Histidins eingeht.^[426] Auch Tyrosin¹⁰ ist in der Lage diese Wechselwirkungen einzugehen, jedoch erfordert dies eine Dislokation des aromatischen Rests, wodurch die Hydroxyl-Position aus dem hydrophoben Kern herausragt.^[426] Dies verändert nicht nur die Oberfläche und damit eventuelle DNA-Bindungseigenschaften des Zinkfingers, sondern verringert gleichzeitig die thermodynamische Stabilität, wenngleich das Ausmaß im Vergleich zur Leucin-Mutante geringer ausfällt.^[426] WEISS *et al.* erweiterten ihre Strategie und nutzen Cyclohexanylalanin als synthetische Aminosäure, um dynamische Bewegungen innerhalb des hydrophoben Kerns aufzuklären.^[192] Die Autoren konnten zeigen, dass durch den Einbau der im Vergleich zum Phenylalanin voluminöseren Seitenkette das $\beta\beta\alpha$ -Motiv zwar erhalten, jedoch eine Verminderung der Zinkaffinität aufgrund des Verlust der aromatischen Wechselwirkungen beobachtet wurde.^[192] Diese Untersuchungen betonten die Bedeutung der aromatischen Seitenkette für die strukturelle Integrität des Zinkfingermotivs.

3.2.2 Modifikationen außerhalb des hydrophoben Kerns - Vorarbeiten

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurden Mutationen an multiplen Positionen des Peptids durchgeführt, sowohl im β -*hairpin* als auch in der α -Helix.^[39,427] Im Speziellen soll hierbei die Arbeit von THORNTON *et al.* erwähnt werden, die den Einfluss der Beschaffenheit des *turns* auf die Stabilität und Funktionen des Zinkfingerpeptids untersuchen wollten.^[428] Hierfür wählten Sie als Modell den dritten Finger des Yin Yang1-Proteins, da dieser über interessante DNA-Bindungsmotive verfügt und der *turn* aus vier, statt den im Zinkfingermotiv üblichen zwei Aminosäuren besteht.^[428] Sie verwendeten das synthetische β -*turn*-Dipeptid (BTD), da in früheren Studien der HIV-1-Protease gezeigt werden konnte, dass der Einbau dieses *turn*-Mimetikums Auswirkungen auf die Aktivität hatte.^[40] NMR-spektroskopische Untersuchungen enthüllten, dass eine nahezu identische Faltung erreicht wurde, wobei nur vereinzelt Differenzen in der chemischen Verschiebung festgestellt werden konnten. Eine Weiterentwicklung des BTD, das keine Vorzugskonformation aufgrund des Lactam-*puckerings* besitzt, ist das von GEYER *et al.*^[33] entwickelte Hot=Tap. Durch zusätzliche β -Verzweigung weist dieses *turn*-Mimetikum im Vergleich zu BTD eine rigidere Struktur auf. Daher erschien es logisch, den Einfluss, den Hot=Tap im 3YY1-Zinkfinger ausüben kann zu untersuchen und sowohl mit dem nativen- als auch mit dem BTD-Zinkfinger zu vergleichen. Eine detaillierte Charakterisierung dieser Systeme fand im Rahmen der eigenen Masterarbeit^[429] statt, deren Ergebnisse kurz zusammengefasst werden sollen.

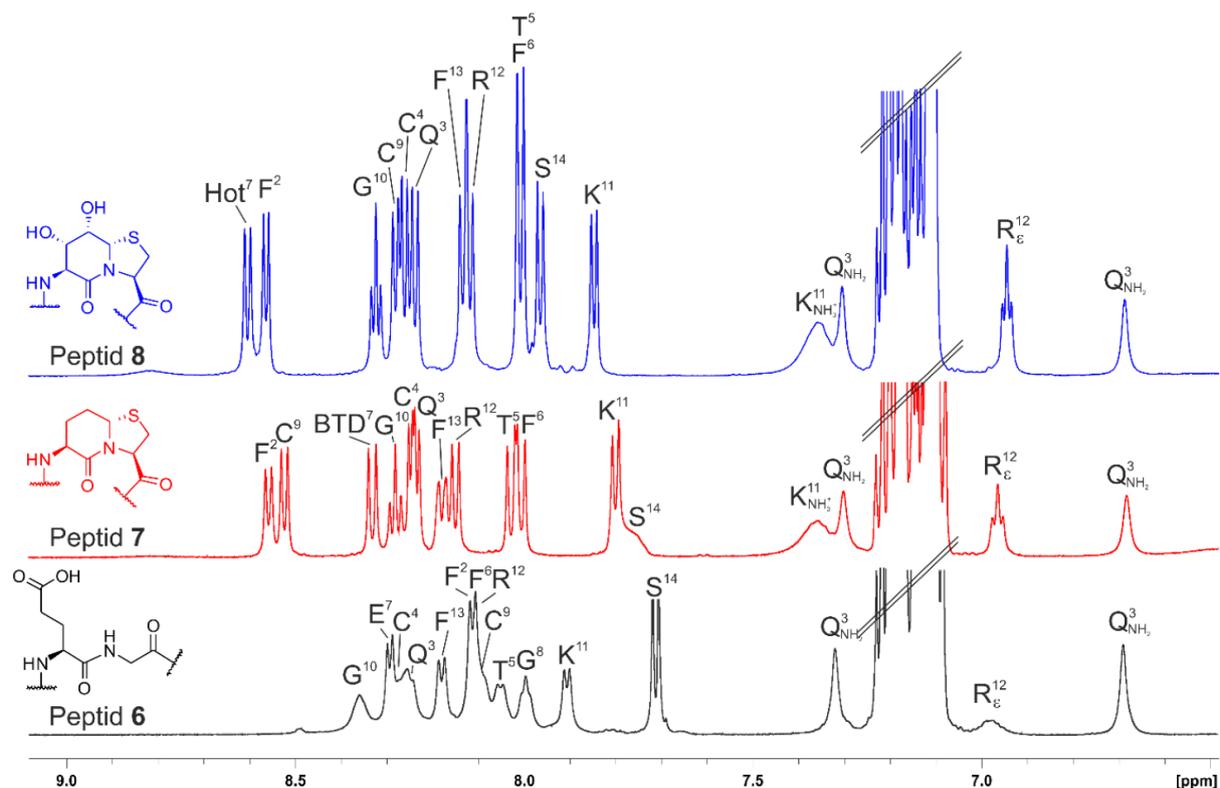


Abbildung 54: Vergleich der NMR-Ausschnitte des amidischen Bereichs von drei apo-Zinkfingerpeptiden, die in der Masterarbeit von PHILIP HORX^[429] untersucht wurden. Durch den intensiven *turn*-induzierenden Effekt der β -*turn*-Mimetika Hot=Tap und BTD im Peptid 7 und 8 wurde eine hohe Dispersion der Signale durch eine Teilfaltung erhalten. Peptid 6 und 8 600 MHz, 300 K, H₂O/D₂O 9:1, pH = 5.9, 5.3 und Verbindung 7 500 MHz, 300 K, H₂O/D₂O 9:1, pH = 5.9

Um den Ausgangspunkt zu definieren, erfolgte zunächst die Synthese der nativen Sequenz an der festen Phase, ausgehend vom dritten Zinkfinger der Kristallstruktur von YY1.^[250] Sowohl Reinheit als auch Löslichkeit des *wild-types* waren unzureichend, was auf mögliche Aggregat-Bildung zurückgeführt wurde. Daher wurden die Arginine an Position 20 und 24 durch Lysine ersetzt, was ein gängiges Verfahren für die Erhöhung der Stabilität gegenüber Aggregationen beim Design von Peptiden und Proteinen darstellt.^[430,431] Diese modifizierte Sequenz wird im weiteren Verlauf der Arbeit dennoch als 3YY1 gekennzeichnet. Nach Zugabe von Zink-Ionen sowie Erhöhung des pH-Werts, wurde eine $\beta\alpha$ -Tertiärstruktur des Zinkfingers anhand der klassischen TOCSY- und NOESY-Muster bestätigt. Anschließend erfolgte die Synthese der Zinkfingerpeptide mit artifiziellem β -*turn*. Trotz der erhöhten Rigidität, die Hot=Tap sowohl auf Bausteinebene als auch in verschiedenen peptidischen Umgebungen aufweist,^[33,432] ist der Unterschied der synthetischen Zinkfingerpeptide marginal.^[429] Beide Derivate sind in der Lage, eine stabile $\beta\alpha$ -Faltung auszubilden, die im Vergleich zum nativen Zinkfinger nahezu identisch ist. Interessanterweise konnte erneut eine Steigerung der Löslichkeit beobachtet werden, was durch ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis im ¹H-NMR belegt werden konnte. Zusätzlich zeigte der Hot=Tap modifizierte Zinkfinger, im folgenden ZFV-1 genannt, eine höhere Reinheit vor der Isolierung mittels semipräparativer HPLC. Ein möglicher Grund für die gesteigerte Löslichkeit könnte eine Vorfaltung von ZFV-1 im Vergleich zum nativen 3YY1 sein. Hot=Tap induziert hierbei eine teilgefaltete Struktur mit einem β II'-*turn*, was durch eine erhöhte Dispersion der Signale im ¹H-NMR

demonstriert werden konnte.^[429] Dies ermöglichte im Vergleich zu 3YY1 die nahezu vollständige Charakterisierung des *apo*-Peptids. Der Unterschied in der Vorfaltung zeigt keine Auswirkung in Gegenwart der Faltungsbedingungen (pH > 5.8, 1.5 eq Zn^{2+}). Da der Einbau von Hot=Tap im β -turn des Zinkfingerstrukturmotivs toleriert wurde und sogar einen positiven Einfluss auf Löslichkeit und Reinheit ausübte, wurden sämtliche nachfolgenden Derivate mit dieser Modifikation versehen. Die Fragestellung, warum nicht BTD als käufliche Aminosäure verwendet wurde ist naheliegend, lässt sich jedoch leicht beantworten. Ein großer Vorteil der Synthesestrategie zur Darstellung von Hot=Tap, die von ECKHARDT *et al.*^[33] optimiert wurde, liegt sowohl in ihrer Einfachheit als auch der Möglichkeit, im Multigramm-Maßstab durchgeführt zu werden. Einzig allein der Schlüsselschritt, die Kondensation der Ribose mit Cystein benötigt laut Literatur zwei Wochen Reaktionszeit.^[33] Durch die Verwendung von Mikrowellenstrahlung konnte dieser Schritt weiter optimiert und die Reaktionszeit auf eine Stunde reduziert werden, ohne einen signifikanten Ausbeuteverlust in Kauf nehmen zu müssen. Weiterhin rigidifiziert die β -Verzweigung die Konformation des Zinkfingerpeptids und ermöglicht zusätzliche Modifikationen des β -turns durch die Hydroxyl-Gruppen.

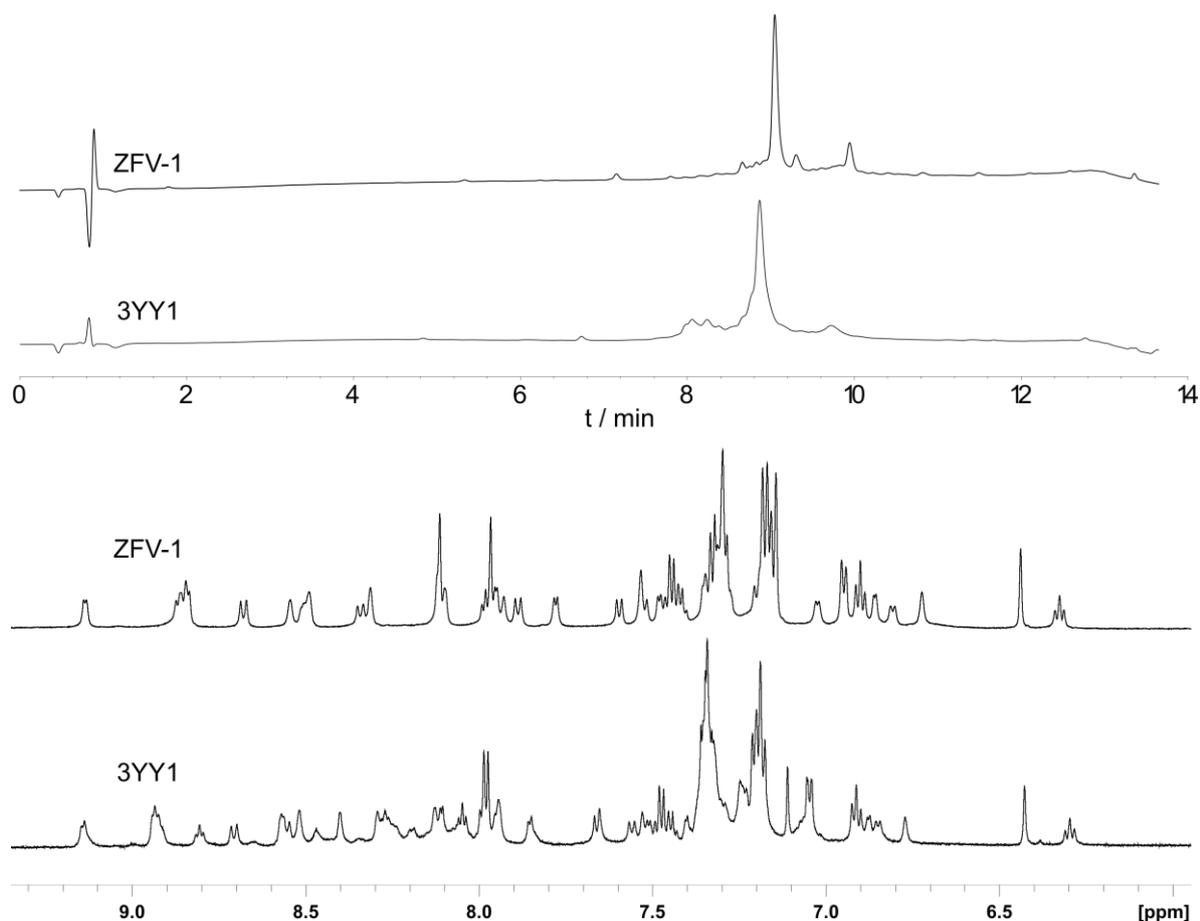


Abbildung 55: Gegenüberstellung der Zinkfingerpeptide 3YY1 (nativ) und ZFV-1 (modifizierter β -turn mit Hot=Tap) bezüglich der Reinheit und Faltungseigenschaften. Der Vergleich der HPLC-Chromatogramme (oben) beider Roh-Peptide zeigt eine geringe Steigerung der Reinheit durch den Einbau von Hot=Tap. Zwar nimmt das Verhältnis von Zielverbindung zu Nebenprodukten nur leicht zu, die bessere Separation der Spezies ermöglichte jedoch eine einfachere Aufarbeitung mittels semipräparativer-HPLC. Die signifikanten Unterschiede im ¹H-NMR der *apo*-Zinkfingerpeptide verschwinden nach Zugabe von 1.5 eq. Zn^{2+} (unten). ZFV-1, 600 MHz, 300 K, H_2O/D_2O 9:1, 1.5 eq. Zn^{2+} , pH = 5.8; 3YY1, 600 MHz, 300 K, H_2O/D_2O 9:1, 1.5 eq. Zn^{2+} , pH = 6.0.

3.2.3 Erstellung eines Strukturbilds der Zinkfingervariante-1

Im Kapitel 3.2.1 wurde die Bedeutung der zentralen Aminosäure im hydrophoben Kern, dem Phenylalanin hervorgehoben. Während der Charakterisierung der Zinkfingervarianten von 3YY1 durch NMR-Spektroskopie, wurde der Fokus auf den aromatischen Bereich des NOESY-Spektrums gelegt (Abbildung 57). Zwar enthält die Sequenz vier Phenylalanine, die jedoch durch ihre unterschiedliche chemische Umgebung separierte Signalsätze liefern. Die hochfrequente Rotation der Phenylgruppen um χ_2 führt zu einem schnellen konformationellen Austausch, infolgedessen ein AA'BB'C-Spin-System erhalten wurde. Zusätzlich wurde eine Überlappung der ζ -Protonen von Phe², Phe⁶ und Phe¹⁷ mit den jeweiligen ϵ -Protonen beobachtet. Das Phe¹³, welches die zentrale Position im hydrophoben Kern einnimmt, bricht dieses Muster auf und zeigt für ein aromatisches System deutlich abgeschirmte Signale sowie eine exzellente Dispersion der drei Kreuzsignale. Die Ursache dieser außergewöhnlichen Eigenschaften liegt in der chemischen Beschaffenheit des hydrophoben Kerns. Dieser ist zwar dicht gepackt, erlaubt jedoch eine schnelle Rotation. Weiterhin ist das Phe¹³ in der Lage, eine *edge-to-face*-Wechselwirkung mit dem N-terminalen Histidin²² einzugehen, die die starke Abschirmung des ζ -Protons von 6.32 ppm in beiden Zinkfingerpeptiden erklärt. Die vollständige Zuordnung der TOCSY und NOESY-Spektren erlaubt es, NMR-Strukturberechnungen durchzuführen. Diese wurden analog zu Kapitel 3.1.1 mittels *Xplor-NIH*^[400] und dem *efx2*-Kraftfeld^[402] durchgeführt. Die Generierung der *restraints* mit anschließender Einteilung in vier Kategorien erfolgte aus den Integralen der NOE-Kreuzsignalen. Als Referenz diente der Abstand von Phe¹³ ϵ zu Phe¹³ ζ , der auf 2.5 Å festgelegt wurde. Zunächst wurden Strukturen ohne die Anwesenheit von Zink und Wasserstoffbrückenbindungen erstellt. Diese Modelle lieferten Hinweise auf die Geometrie der Zinkkoordinationsphäre und potenzielle Wasserstoffbrücken. Letztere konnten durch Temperaturreihen im ¹H-NMR identifiziert werden (Abbildung 56). Dazu wird ausgelesen, um wie viele ppb sich das Signal pro ein Kelvin Temperaturänderung verschiebt. Befindet sich ein Amidproton in einer Wasserstoffbrückenbindung, so zeigt es eine geringe Abhängigkeit von der Temperatur, während die chemische Verschiebung von lösungsmittelzugänglichen NH-Protonen sich stark ändert. Dieses Verfahren kann generell auf alle Peptide angewandt werden, die eine formstabile Struktur besitzen und dadurch keinen schnellen konformationellen Austausch aufweisen.^[398]

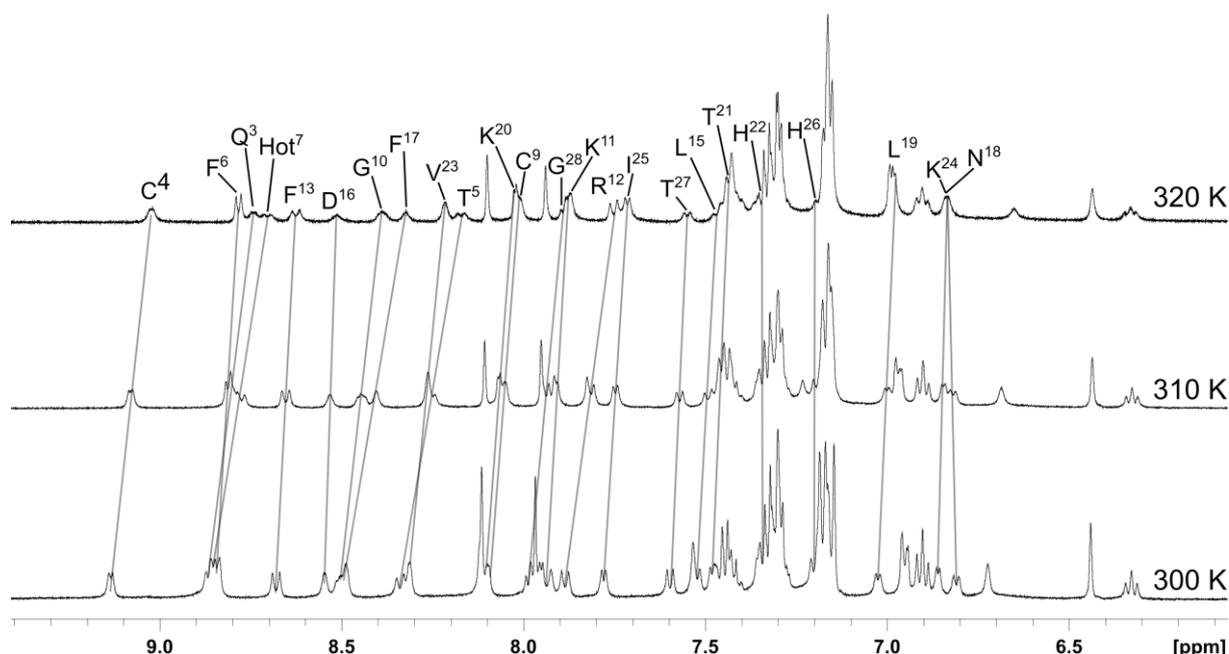


Abbildung 56: Identifikation von Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Zinkfingers durch Temperaturgradienten. Die Aufnahme von ^1H -Spektren bei unterschiedlicher Temperatur enthält die Abhängigkeit der chemischen Verschiebung amidischer Protonen von der Temperatur. Dadurch können Gradienten berechnet werden, die einen Hinweis geben, ob ein Amid-Proton in eine Wasserstoffbrückenbindung involviert ist. ^1H -NMR-Spektroskopiebedingungen: 500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, 1.5 eq. Zn^{2+} , pH = 5.8, Temperatur wie angegeben.

Tabelle 1: Temperaturgradienten der Zinkfingervariante-1, wobei niedrige Werte gelb hervorgehoben wurden und eine potenzielle Wasserstoffbrückenbindung kennzeichnen. Da F^2 , S^{14} , H^{22} und H^{26} nicht eindeutig identifiziert werden konnten, wurde ihre Temperaturabhängigkeit nicht angegeben.

| Aminosäure | Temperaturgradient ppb / K | Aminosäure | Temperaturgradient ppb / K |
|-----------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|
| Q^3 | 7.26 | D^{16} | 0.82 |
| C^4 | 5.24 | F^{17} | 7.01 |
| T^5 | 10.0 | N^{18} | -0.31 |
| F^6 | 2.89 | L^{19} | 3.30 |
| Hot^7 | 7.42 | K^{20} | 6.20 |
| C^9 | 6.15 | T^{21} | 2.51 |
| G^{10} | 6.87 | V^{23} | 5.25 |
| K^{11} | 4.28 | K^{24} | 1.28 |
| R^{12} | 8.22 | I^{25} | 2.88 |
| F^{13} | 2.39 | T^{27} | 4.90 |
| L^{15} | 4.51 | G^{28} | 5.43 |

Wie in Abbildung 56 und Tabelle 1 zu erkennen ist, besitzt das Zinkfingerstrukturmotiv mehrere amidische Protonen, die in eine Wasserstoffbrückenbindung involviert sein könnten. Im Bereich des β -hairpins sind dabei besonders F^6 und F^{13} mit ihrer geringen Temperaturabhängigkeit auffällig. Die α -Helix enthält eine Vielzahl an niedrigen Gradienten, wobei insbesondere D^{16} und N^{18} mit 0.82

und -0.31 ppb/K hervorrufen. Anschließend wurde das Zink-Ion den Strukturberechnungen hinzugefügt, und durch *restraints* tetraedrisch von den Seitenketten von Cys⁴, Cys⁹, His²² und His²⁶ umgeben. Zwar kann Hot=Tap synthetisch als eine Kombination von Threonin und Prolin aufgefasst werden, dennoch sind neue Topologie- und Parameter-Dateien für die Berechnung der β -turn-modifizierten Zinkfingerpeptide notwendig, die mit Hilfe des *Charmm-gui* Webtools erhalten wurden.^[433] Diese Parameter basieren auf dem CHARMM *general force field* (CGenFF)^[434] und sind mit starken Vereinfachungen behaftet, erlaubten jedoch die entsprechenden Simulationen beziehungsweise NMR-Strukturberechnungen durchzuführen. Letztere benötigen die *restraints*, die den größten Anteil zur energetischen Bewertung der Konformation beisteuern, weswegen kleinere Ungenauigkeiten einzelner Parameter teilweise vernachlässigt werden können.^[288] Zwar war der Aufwand für die Übertragung der von *Charmm-gui* generierten Parameter auf das *eefx2*-Kraftfeld überschaubar, die Topologie des β -turn-Mimetikums bereitete indessen eine Herausforderung. Diese Tatsache war der Zusammensetzung des Hot=Taps als Dipeptid geschuldet. Sämtliche Aminosäuren, die im *eefx2*-Kraftfeld abgelegt wurden, sind isolierte Aminosäuren. Die Definition von Hot=Tap als Dipeptid beziehungsweise als einzelne Aminosäure führte zu einer inkorrekten Verknüpfung der Amidbindungen mit benachbarten Aminosäuren. Daher wurden zwei artifizielle Bausteine definiert, deren Seitenketten jeweils einen Teil von Hot=Tap nachahmten. Nach Generierung der Ausgangsstruktur, jedoch vor dem *simulated-annealing*-Protokoll, wurde anschließend ein *patch* angewandt, der überflüssige Wasserstoffatome entfernte und den δ -Kohlenstoff des "Hot"-Teils des Dipeptids mit dem Schwefel und Stickstoff des "Tap"-Teils fusionierte.^[400] Die so erhaltene Struktur besaß die korrekte Konnektivität und konnte in den NMR-Strukturberechnungen eingesetzt werden (Abbildung 57).

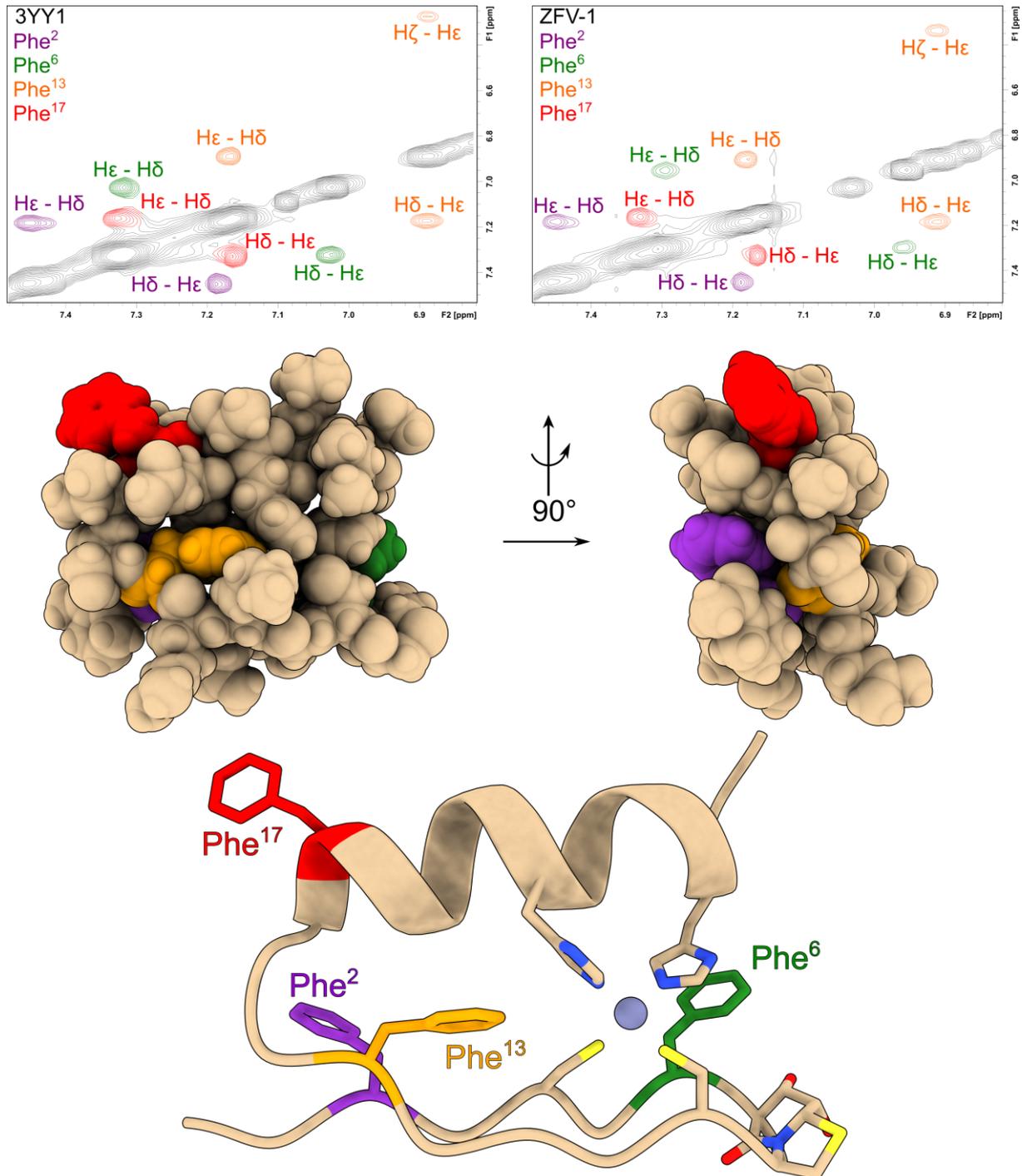


Abbildung 57: Ausschnitt des aromatischen Bereichs der NOESY-Spektren für 3YY1 (links) und ZFV-1 (rechts). Sämtliche Phenylalanine des Zinkfingers können durch ihre gute Dispersion zugeordnet werden, wobei Phe¹³ sich im hydrophoben Kern befindet durch seine chemischen Verschiebungen auszeichnet. Dadurch konnten *restraints* erhalten werden, die eine NMR-Struktur-Berechnung faszilitierten. Die Darstellung der Konformation mit der niedrigsten Energie durch VAN-DER-WAALS-Radien (mittig) demonstriert die Kompaktheit des hydrophoben Kerns. Unten: Dreidimensionale Abbild der Zinkfingervariante-1, wobei das *backbone* des Peptids schematisch abgebildet wurde. Die Phenylalanine wurden in Analogie zum NOESY-Spektrum farbkodiert und sind, wie die Zinkbindenden Seitenketten und Hot=Tap explizit dargestellt.

Wie im unteren Teil der Abbildung 57 zu erkennen ist, entspricht ZFV-1 der $\beta\beta\alpha$ -Tertiärstruktur eines klassischen Zinkfingers. Als ein signifikanter Unterschied ist der β -turn hervorzuheben, der im Vergleich zum β II-Typ im 3YY1, nun einen β II'-Typ annimmt. Diese Veränderung mag zunächst von

geringer Bedeutung erscheinen, da die chemischen Verschiebungsänderungen nur ein geringes Ausmaß besitzen, jedoch kann die geänderte Geometrie des *turns* entweder die Struktur stabilisieren, wie am Beispiel des Foldons von ECKHARDT *et al.*^[33] gezeigt wurde (Abbildung 7), oder die Zinkaffinität des Peptids drastisch herabsetzen, wie HORNE *et al.* in einer aktuellen Studie belegten.^[39] Hierbei wurde deutlich, dass Cys-X₂-Cys diese Mutation nicht tolerierten, während die Zinkaffinität in Cys-X₄-Cys-Zinkfingern erhalten blieb. Eine detaillierte Betrachtung der Aminosäuren in Nachbarschaft zum *turn* enthüllte, dass der β -*hairpin* des Zinkfingers im Vergleich zum klassischen Modell abweicht. Die Rückgratatome von C⁹ und G¹⁰ sind verzerrt, was der tetraedrischen Koordinationssphäre des Zink-Ions geschuldet ist. Diese Beobachtung wird durch einen intensiven NOE-Kontakt von C⁹NH zu G¹⁰NH belegt, der für einen klassischen β -*hairpin* unüblich ist.

3.2.4 Charakterisierung der Rotationsbewegung von Phe¹³

Die Darstellung des Konformers mit der niedrigsten Energie durch VAN-DER-WAALS-Radien (Abbildung 57) hebt die Kompaktheit des hydrophoben Kerns hervor, der trotzdem eine schnelle Rotation von Phe¹³ um χ_2 erlaubt. Um diese Bewegungen charakterisieren zu können, entwickelten WÜTHRICH *et al.* NMR-Spektroskopische Methoden, die es erlaubten, die Rotationsgeschwindigkeit von Phenylalaninen im Trypsin-Inhibitor BPTI zu beschreiben.^[435] Hierfür wurde ein großer Temperaturbereich verwendet, um die Beweglichkeit von langsam rotierenden aromatischen Ringsystemen zu erhöhen. Diese Methode ist auf das System des Zinkfingers jedoch nicht direkt übertragbar, da zum einen sämtliche Phenylalanine schnell rotieren und zweitens die Temperaturstabilität der Peptide stark begrenzt ist. Bei einer Temperatur von 330-340 K zeigte ZFV-1, welches bereits eine größere thermodynamische Stabilität besitzt, einen starken Verlust des Signal-Rausch-Verhältnis. Ebenso ist die intensive Abkühlung dieser Strukturen von Problemen begleitet, da das wässrige Milieu unterhalb von 0°C zu gefrieren droht, wodurch die Homogenität des Magnetfelds signifikant gestört wird. Um den Gefrierpunkt der Zinkfingerpeptidlösung herabzusetzen, wurden 20% (v/v) Methanol-*d*₄ hinzugesetzt. Dies erlaubte dennoch die Ausbildung der Tertiärstruktur, wodurch ¹H-NMR-Spektroskopie bei tieferer Temperatur durchgeführt werden konnte (Abbildung 58).

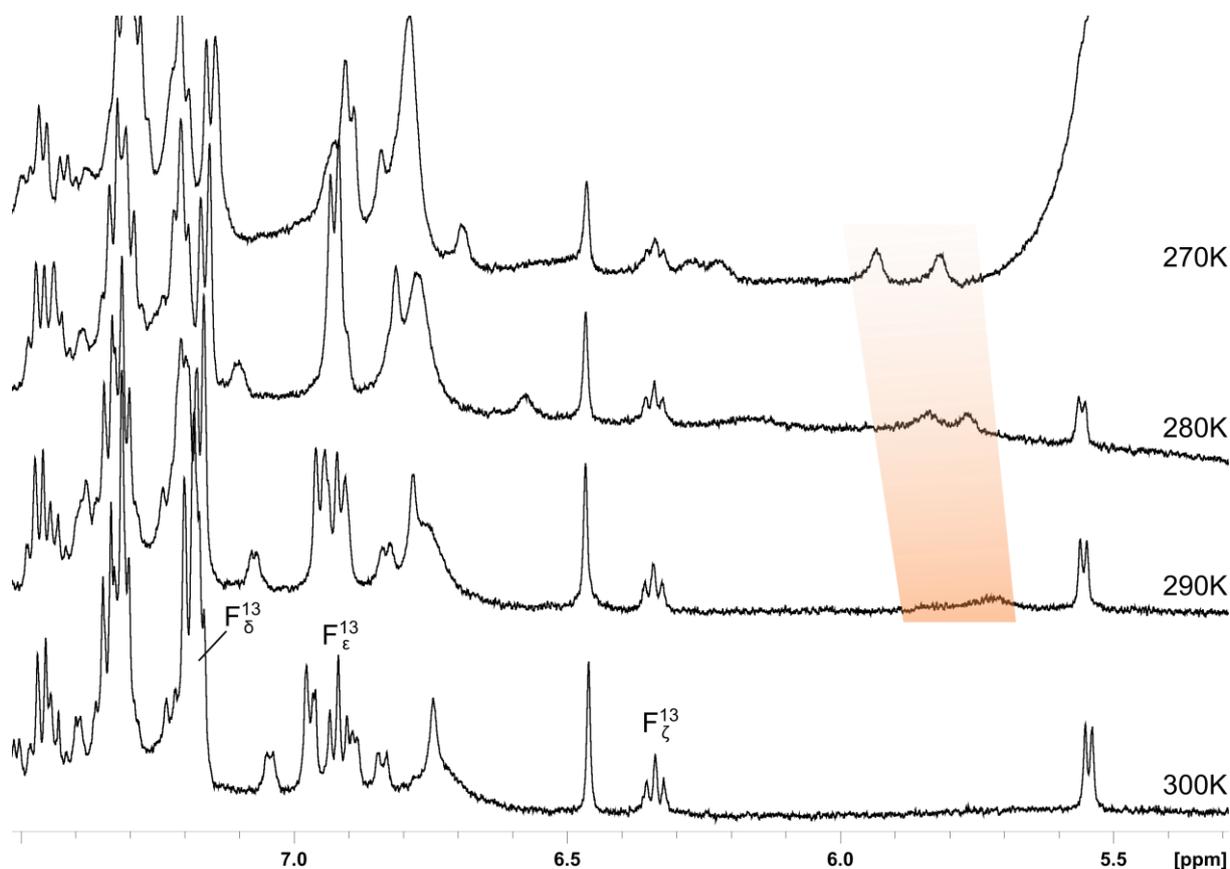


Abbildung 58: Ausschnitt der aromatischen Protonen von Phe¹³ aus der Temperaturreihe von ZFV-1 mit 20% Methanol-*d*₄ als Additiv um das Einfrieren der Probe zu verhindern. Durch die große Signalüberlappung konnten keine eindeutigen Aussagen über die Rotationsbewegungen von Phe¹³ um χ_2 getroffen werden. Im Bereich von 5.8 ppm erscheinen zwar neue Signale, die jedoch durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie keiner aromatischen Seitenkette zugeordnet werden konnten. Es konnten keine tieferen Temperaturen als 270 K erreicht werden, da die Qualität der Wasserunterdrückung durch die erhöhte Viskosität stetig abnahm. 500 MHz, H₂O/D₂O/MeOD_{d4} 7:1:2, 1.5 eq Zn²⁺, pH = 5.9.

Abbildung 58 hebt die Limitationen der Niedrigtemperatur-Messungen von Zinkfingerproteinen durch Zugabe von Methanol hervor. Ein enormer Phasenfehler wurde beobachtet, der einerseits auf die Anwesenheit von Methanol beruht, auf der anderen Seite durch die erhöhte Viskosität der Lösung bei niedriger Temperatur bedingt wurde. Letzteres führte zur Herabsetzung der Homogenität des Magnetfelds innerhalb der Lösung. Die Signale der Seitenkette von Phe¹³ konnten zwar bei 300 K identifiziert werden, überlagerten jedoch zunehmend bei tieferer Temperatur mit weiteren aromatischen und amidischen Protonen. Zudem wurde keine selektive Verbreiterung verzeichnet, was die Beobachtung einer schnellen Änderung des χ_2 -Diederwinkels unterstützt. Um eine detaillierte Beschreibung der Beweglichkeit von aromatischen Seitenketten des Zinkfingerproteins zu ermöglichen, sollten alternative Methoden entwickelt werden, die idealerweise Informationen, die anhand der NMR-Spektroskopie erhalten wurden, verwenden können. Das Potenzial von Moleküldynamik-Simulationen konnte bereits bei der Charakterisierung der korrelierten Dynamik des Scharnier-Peptids (s. Kapitel 3.1) demonstriert werden. Daher ist es naheliegend, diese leistungsstarke Methode auch für die atomare Betrachtung von Zinkfingerpeptiden anzuwenden. Zunächst muss hierbei erneut die Frage des geeigneten Kraftfelds beantwortet werden. Die Literaturrecherche ergab zunächst, dass nahezu

sämtliche Kraftfeldfamilien, die für die Simulation von biologischen Makromolekülen konzipiert wurden, geeignet für die Analyse von Zinkfingerpeptiden wären. Daher erfolgte zunächst ein Stabilitätsvergleich von 3YY1 in kurzen Simulationen mit verschiedenen Vertretern prominenter Kraftfelder. Um artifizielle Ladungseffekte zu vermeiden, wurde der N-Terminus mit Acetyl und der C-Terminus mit N-Methylamin *g capped*. Weiterhin wurden keine Einschränkungen der Zinkkordinationssphäre auferlegt, da die adäquate Deskription des Zinkfingerzentrums ein wichtiger Faktor für die Beurteilung des Kraftfelds darstellt. Um die Stabilität von 3YY1 in den kurzen MD-Simulationen zu evaluieren, wurde der Verlauf der RMSD gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 59).

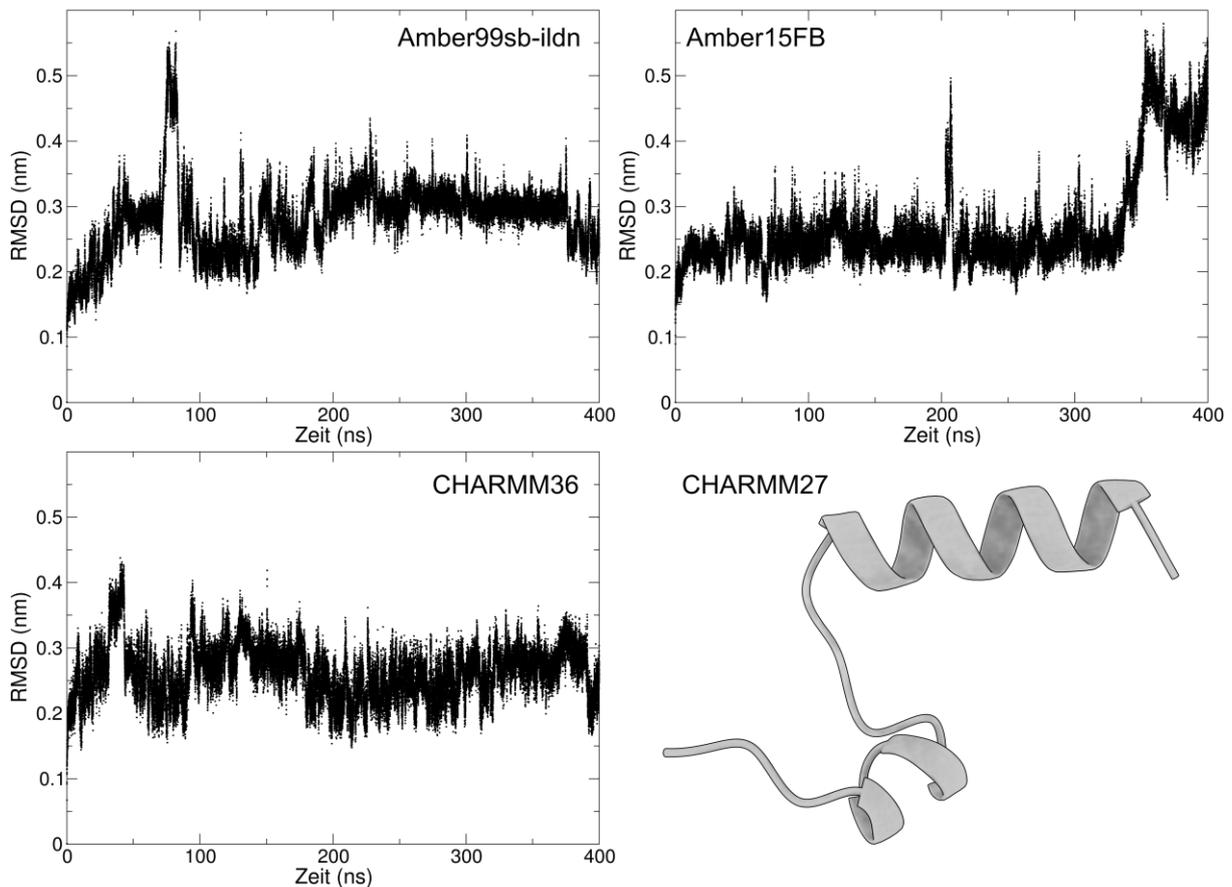


Abbildung 59: Kraftfeldevaluation für die Stabilität von 3YY1 durch Vergleich der RMSD-Verläufe, die nach kurzen MD-Simulationen erhalten wurden. Sämtliche untersuchten Kraftfelder zeigen einen niedrigen RMSD-Wert, wobei Amber99Ssb-ildn^[436] und Amber15FB^[437] einen kurzen Übergang zu höheren RMSD-Werten zeigten. CHARMM27 wurde ebenfalls untersucht, zeigte jedoch nach 200 ns eine Entfaltung der Struktur (unten rechts).

Die Analyse der RMSD-Entwicklung verschiedener Kraftfelder enthüllt, dass das $\beta\alpha$ -Zinkfingermotiv von drei untersuchten Kraftfeldern ausgehend von der NMR-Struktur stabilisiert wurde. Sowohl Amber99sb-ildn^[436] als auch CHARMM36^[346] zeigten nur kurzzeitige Wechsel zu höheren RMSD-Werten. Amber15FB^[437] folgte diesem Trend bis 350 ns mit anschließendem Anstieg des RMSD-Verlaufs. Als weiteres Kraftfeld wurde eine MD-Simulation mit CHARMM27 durchgeführt, wobei schon nach 200 ns eine signifikante Veränderung der Struktur beobachtet wurde. Die Darstellung der dreidimensionalen Anordnung demonstriert, dass zwar die C-terminale α -Helix intakt war, der β -hairpin

jedoch entfaltet wurde. Der Vergleich der RMSD-Verläufe und der Konformationen lieferte nur unzureichende Anhaltspunkte für die Selektion des idealen Kraftfelds für die Simulation von 3YY1. Die begrenzten Ressourcen, die für die Simulation der Zinkfingerpeptide zur Verfügung standen, verhindern eine vollumfängliche, parallele Betrachtung mit drei verschiedenen Kraftfeldern. Amber99sb-ildn lieferte nach längeren Simulationen eine Konformation, die große Ähnlichkeit zur NMR-Struktur aufzeigte, weshalb Amber99sb-ildn als Kraftfeld für sämtliche MD-Simulationen von Zinkfingern in dieser Arbeit verwendet wurde. Zusätzlich ermöglicht die Anwendung von *ACPYPE*, einer auf python-basierenden Umgebung, die unkomplizierte Parametrisierung von Amber-kompatiblen Aminosäuren.^[438] Nachdem das geeignete Kraftfeld selektiert wurde, stellt sich erneut die Frage nach der Simulationsdauer. GODWIN *et al.*^[406] untersuchten genau diese Problematik, indem sie lange MD-Simulation (3 μ s) des NEMO-Zinkfingers durchführten und die Clusterpopulationen von verschiedenen Zeitabschnitten analysierten. Die Autoren konnte zeigen, dass bestimmte Fluktuationen der strukturellen Elemente erst ab einer Simulationsdauer von 1 μ s beobachtet wurden. Anhand dieser Ergebnisse, in Kombination mit den gegebenen Rechenkapazitäten, erschien 1.5 μ s als ein idealer Kompromiss. Zwar wurde während den Testsimulationen nur eine minimale Entfaltung von Sekundärstrukturelementen vermerkt, dennoch wurden leichte *restraints* an der Ligandensphäre des Zink-Ions angewandt, um eine tetraedrische Koordination während der gesamten Simulation zu gewährleisten. Die Zielsetzung dieses Kapitels lag auf der Dynamik des hydrophoben Kerns, die signifikant durch die Beweglichkeit von Phe¹³ beeinflusst wird. Um die Flexibilität des Phenylrings in Kontext setzen zu können, wurde nicht nur die Rotationsbewegung von Phe¹³, sondern von sämtlichen Phenylalaninen in 3YY1 und ZFV-1 untersucht. Die MD-Simulation von ZFV-1 wurde unter denselben Bedingungen wie 3YY1 durchgeführt, wobei die Parameter von Hot=Tap durch *ACPYPE* erzeugt wurden.^[438]

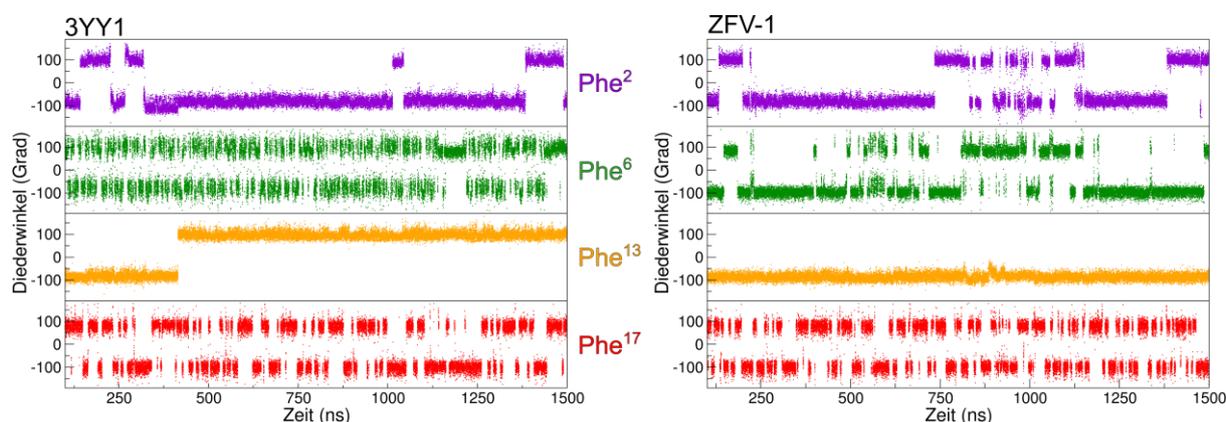


Abbildung 60: Entwicklung der χ_2 -Torsion für alle Phenylalanine der untersuchten Zinkfingerpeptide (links 3YY1, rechts ZFV-1). Anhand der Frequenz der Übergänge kann eine direkte Reihenfolge der Beweglichkeiten aufgestellt werden und zeigt, dass Phe⁶ im 3YY1 am flexibelsten ist, gefolgt von Phe¹⁷ und Phe². Phe¹³ ist in beiden Derivaten stark eingeschränkt, wobei 3YY1 eine halbe Umdrehung zulässt. Der Einbau vom β -turn-Mimetikum Hot=Tap verringert die Beweglichkeit des naheliegenden Phe⁶ signifikant. Die Farbkodierung erfolgte in Analogie zu Abbildung 57.

Die Entwicklung des χ_2 -Diederwinkel der vier Phenylalanine (Abbildung 60) demonstriert die unterschiedlichen Beweglichkeiten der Seitenketten aufgrund ihrer chemischen Umgebung. Phe² führte

während der Simulation einige Rotationen durch, wobei die Nähe des hydrophoben Kerns Einschränkungen auf die Flexibilität ausübte. Diese Beobachtung kann direkt auf ZFV-1 übertragen werden. Im Kontrast stehen hierzu die Beweglichkeiten von Phe⁶ und Phe¹⁷. In 3YY1 waren beide Phenylalanine in der Lage frei zu rotieren, was anhand zahlloser Wechsel der χ_2 -Torsion angezeigt wurde. Die ungehinderte Rotation von Phe¹⁷ wurde erwartet, da diese Aminosäure am N-terminalen Anfang der α -Helix positioniert und neben wenigen hydrophoben Kontakten mit benachbarten Seitenketten nahezu vollständig vom Lösungsmittel umgeben ist. Ein ähnliches Bild kann von Phe⁶ gezeichnet werden, wobei in der Kristallstruktur von YY1^[250] eindeutig Wechselwirkungen zu den β -Protonen des His²⁶ sichtbar sind, die einen restriktiven Effekt ausüben sollten. Die zentrale Aminosäure des hydrophoben Kerns, Phe¹³ besitzt eine Beweglichkeit, die zunächst in Widerspruch zu den experimentellen Daten aus der NMR-Spektroskopie steht. Während im TOCSY-Spektrum für alle Phenylalanine ein AA'BB'C-Spin-System beobachtet wurde, was auf eine schnelle Rotation um χ_2 hindeutet, ist in beiden Derivaten nur ein, beziehungsweise kein Wechsel des Diederwinkels ersichtlich. Diese Diskrepanz deckt sich jedoch mit dem großen Ordnungsparameter, den WRIGHT und Mitarbeiter durch Relaxationsmessungen im *Xfin-31* Zinkfingerpeptid für die Seitenkette von Phe¹⁰ bestimmt haben.^[227] Sie formulierten die Schlussfolgerung, dass die Rotation zwar eingeschränkt sein muss, dennoch schnell genug, um das entsprechende Spin-System zu erzeugen. Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass der Zusammenhang zwischen Ordnungsparameter und Relaxation nur unter vielen Vereinfachungen beziehungsweise Annahmen erfolgt. Die direkte Betrachtung des Spinsystems zur Charakterisierung der Dynamik ist der Methode von WRIGHT *et al.* vorzuziehen, da die Mittelung von Verschiebungen, beziehungsweise die Frequenzdifferenz, direkt proportional zur benötigten Zeit der Bewegung ist.^[288] Wie schon im Kapitel 3.1.4 wird das Problem des unzureichenden *samplings* von diesen seltenen Ereignissen durch klassische Moleküldynamik-Simulationen ersichtlich.

Während beim Einsatz von *turn*-Mimetika der Fokus häufig auf der unmittelbaren Struktur beziehungsweise den Einfluss auf die benachbarten Aminosäuren lag, sollte bestimmt werden, ob Hot=Tap einen *long-range* Effekt auf die Struktur ausübt. Erstmals ist im ZFV-1 der direkte Einfluss der erhöhten Rigidität durch Hot=Tap als β -*turn*-Mimetikum auf die Beweglichkeit von benachbarten Aminosäuren quantifizierbar (Abbildung 61). Phe⁶ zeigt eine signifikante Reduktion der χ_2 -Torsionswechsel, dessen Effekt auch indirekt im ¹H-NMR erkennbar ist. So erfahren die β -Protonen des His²⁶ in 3YY1, eine starke Abschirmung durch Phe⁶, infolgedessen eine chemische Verschiebung von 2.59 und 2.06 ppm verzeichnet wurde. Dieser Einfluss kann auf den Ringstromeffekt des Phenyls von Phe⁶ zurückgeführt werden und ist abhängig von der Ausrichtung des aromatischen Rings.^[439] Wird die Beweglichkeit um χ_2 nun durch benachbarte Aminosäuren wie Hot=Tap verringert, erhöht sich dadurch die Auswirkungen des Ringstromeffekts, was wiederum zur verstärkten Abschirmung und einer chemischen Verschiebung von 2.48 und 1.59 ppm führt. Durch die geometrische Anordnung der Seitenketten von His²⁶ und Phe⁶, erfährt nur das pro-R-Atom diesen starken Effekt. Somit besitzt

Hot=Tap einen indirekten *long-range*-Effekt, der über drei Strukturelemente, β -Strang, *loop* und α -Helix und 18 Aminosäuren wirkt.

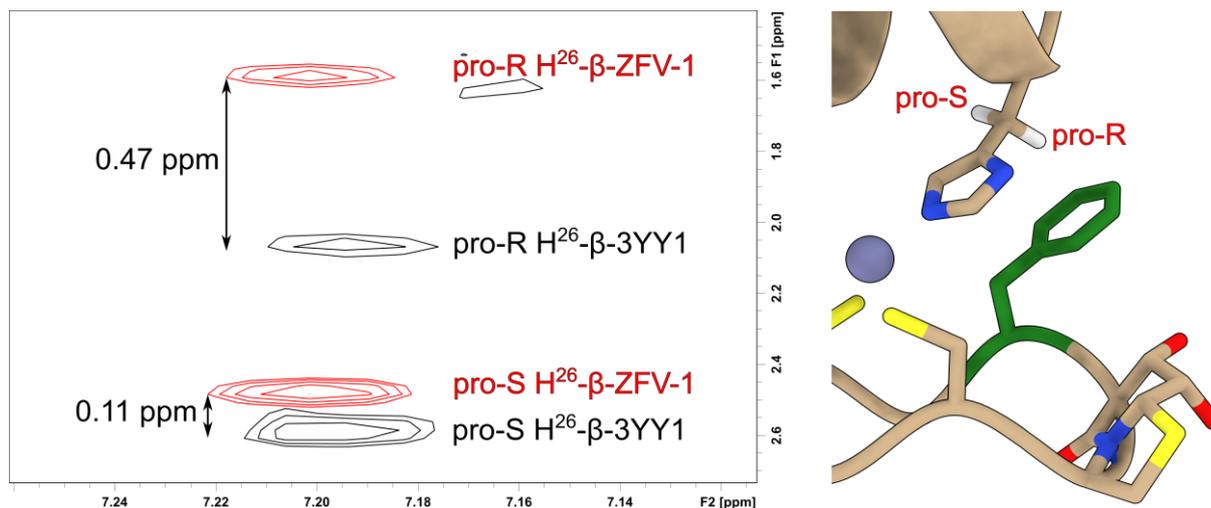


Abbildung 61: *Long-range*-Einfluss der erhöhten Rigidität durch Substitution des β -turns von 3YY1 mit Hot=Tap. Durch die Festigung des β -hairpins wird die Beweglichkeit von Phe⁶ (grün) reduziert, was zu einer verstärkten Auswirkung des Ringstromeffekts auf die β -Protonen von His²⁶ führt. Infolgedessen konnte im TOCSY-Spektrum (600 MHz, H₂O/D₂O 9:1, 1.5 eq Zn⁺², pH = 5.8) eine signifikante Hochfeldverschiebung des pro-R-Protons von His²⁶ beobachtet werden.

3.2.5 Lösungsansatz des unzureichenden *samplings* – Metadynamiken im Zinkfingermotiv

Die Ergebnisse des vorherigen Kapitels demonstrierten, dass die Energiebarriere der Phe¹³ Rotation durch die klassischen MD-Simulationen (1.5 μ s) nicht adäquat beschrieben werden kann. Da die restlichen Phenylalanine jedoch in schneller Rotation sind, ist keine generelle Erweiterung sämtlicher Bewegungen des Zinkfingerpeptids, sondern nur eine selektive Anregung der χ ₂-Rotation von Phe¹³ notwendig. Daher ist die erneute Applikation von *wt*-Metadynamik naheliegend. Auf eine Hauptkomponentenanalyse zur Identifikation von kollektiven Variablen wurde verzichtet, da der χ ₂-Diederwinkel von Phe¹³ im Fokus dieses Kapitels lag und somit die einzige CV bildete. Eine direkte Übertragung der Metadynamik-Parameter aus Kapitel 3.1.4, Höhe des Gaußpotenzials und *biasfactor* war indes nicht möglich, da sowohl die kollektive Variable als auch das untersuchte System unterschiedlich waren. Erste Testsimulationen wurden mit einer Höhe von 1.2 kJ/mol durchgeführt, resultierten jedoch in einer Entfaltung der Tertiärstruktur. Erst eine Absenkung auf 0.125 kJ/mol mit einem Biasfaktor von 3 ermöglichte die Anregung der χ ₂-Rotation, ohne eine Entfaltung des Zinkfingerpeptids zu ermöglichen. Die *wt*-Metadynamik wurde für beide Zinkfingerpeptide, 3YY1 und ZFV-1 durchgeführt und die Entwicklung des χ ₂-Diederwinkels in der nachfolgenden Abbildung zusammengefasst.

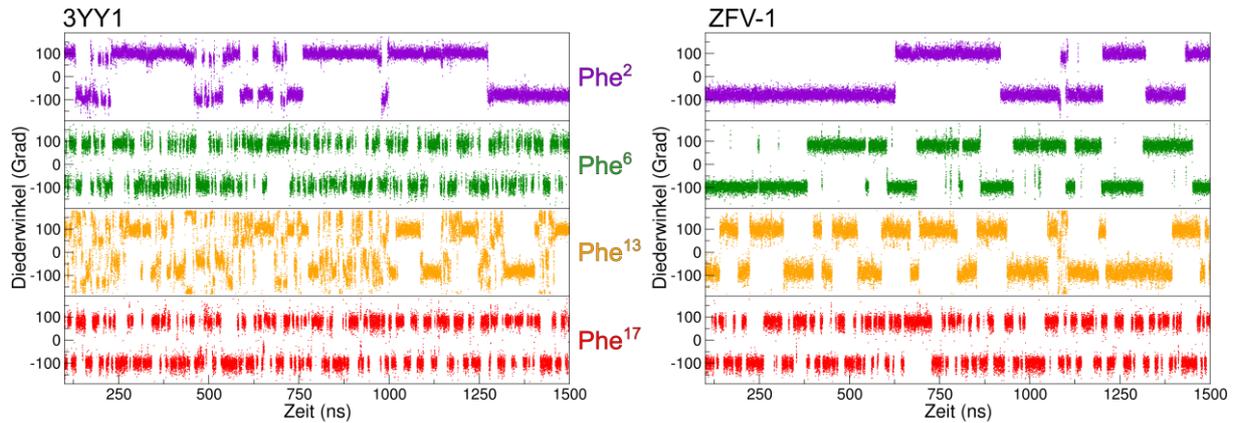


Abbildung 62: Einfluss der *wt*-Metadynamik auf die Beweglichkeit des χ_2 -Diederwinkels sämtlicher Phenylalanine. Die Manipulation der χ_2 -Torsion von Phe¹³ führte zu einer selektiven Anregung der Beweglichkeit, die nur einen geringen Effekt auf die Mobilität benachbarter Aminosäuren ausübte. Im Vergleich zu Abbildung 60 wurde ein enormer Anstieg der Wechsel des χ_2 -Diederwinkels für Phe¹³ beobachtet. 3YY1 (links) verzeichnete dabei eine signifikant größere Flexibilität als ZFV-1 (rechts).

Die Entwicklung der χ_2 -Diederwinkel aller Phenylalanine, die durch den Einsatz der *wt*-Metadynamik erhalten wurde, zeichnet ein eindeutiges Bild. Die selektive Anregung der Phe¹³-Rotationsbewegung übte nur einen indirekten Einfluss auf benachbarte Aminosäuren aus, führte jedoch zur signifikanten Steigerung der eigenen χ_2 -Torsionswechsel. Innerhalb der 1.5 μ s wurden nun zahlreiche Rotationen der Phenylgruppe von Phe¹³ beobachtet. Interessanterweise wurden während der *wt*-Metadynamik auch Diederwinkel von -150 und 150° erkundet, die von den Minima während der klassischen MD-Simulation abweichen. Die Mobilität der verbliebenden aromatischen Seitenketten von Phe², Phe⁶ und Phe¹⁷ änderten sich im Vergleich zur MD-Simulation nur marginal. Phe² soll jedoch gesondert hervorgehoben werden, da eine leichte Erhöhung der Flexibilität um χ_2 dieser Aminosäure verzeichnet wurde. Ein möglicher Grund hierfür ist die Nähe zum hydrophoben Kern. Durch Bewegungen innerhalb des Zentrums, zum Beispiel Rotation der Seitenkette von Phe¹³, könnte es zur kurzzeitigen Destabilisierung des hydrophoben Kerns kommen, was Auswirkungen auf die Flexibilität von Phe² nimmt. Dieser Einfluss auf benachbarte Positionen konnte im Zinkfingerpeptid ZFV-1 nicht beobachtet werden, da Phe² eine Dynamik in Analogie zur MD-Simulation aufweist. Die erhöhte Rigidität des β -turn-Mimetikums Hot=Tap ist erneut in der Einschränkung der Beweglichkeit von Phe⁶ zu erkennen. Unerwarteterweise ist der Effekt dieser Festigung des β -turns nicht nur in den benachbarten Aminosäuren spürbar, sondern führt auch zu einer Verlangsamung der Rotationen von Phe¹³ im Vergleich zur *wt*-Metadynamik des 3YY1. Die Stabilität des β -hairpins nimmt augenscheinlich eine zentrale Rolle bei der Dynamik des hydrophoben Kerns ein und führt zu einer Erhöhung der Energiebarrieren. Um eine detaillierte Charakterisierung dieses *long-range*-Effekts auf die Beweglichkeit zu ermöglichen, wurden die aus der *wt*-Metadynamik erhaltenen Energieprofile der Phe¹³-Rotation beider Derivate miteinander verglichen. Das zentrale Phenylalanin im hydrophoben Kern des dritten Zinkfingers von YY1 zeigt eine Energiebarriere von 17 kJ/mol, was im Vergleich zur Bausteinebene von 10 kJ/mol (s. Kapitel 3.3.2) fast eine Verdopplung darstellt (Abbildung 63). Dennoch ist diese Barriere niedrig genug, um eine Ausbildung des AA'BB'C-Spin-System durch

schnelle Rotation mit Minima bei -90 und 90° zu erlauben. Die Substitution von Gly⁶ und Glu⁷ durch Hot=Tap, mit einhergehender Veränderung der *turn*-Architektur von Typ-II zu II', führte erneut zur Verdopplung der Rotationsbarriere auf 30 kJ/mol. Diese Beobachtung erschien zunächst unglaublich, da auch keine Unterschiede im Verhalten des Spin-Systems für ZFV-1 beobachtet wurden. Ein möglicher Grund könnte die unterschiedliche Startstruktur gewesen sein, da für die MD-Simulation von 3YY1 die Koordinaten des entsprechenden Ausschnitts der Kristallstruktur (PDB: 1UBD) verwendet wurden. Die Startstruktur von ZFV-1 entsprach dem Konformer mit der niedrigsten Energie des NMR-Strukturensemble. Um dies zu überprüfen, wurde ebenfalls eine NMR-Struktur von 3YY1, ausgehend von den NOE-Kontakte berechnet und einer MD-Simulation beziehungsweise *wt*-Metadynamik unterzogen. Die Abweichungen der Ergebnisse waren vernachlässigbar, da sie im Fehlerbereich atomarer Moleküldynamik-Simulationen angeordnet waren.^[440] Zusätzlich wurde die Metadynamik des ZFV-1 mit einer unterschiedlichen Ausgangskonformation wiederholt, führte jedoch zum identischen freien Energieprofil. Daher ist die Annahme, dass Hot=Tap für die Erhöhung der Energiebarriere auf 30 kJ/mol verantwortlich ist, gerechtfertigt. Um die Konvergenz der *wt*-Metadynamik, und damit auch die Qualität der Ergebnisse bewerten zu können, wurde der Verlauf des Gaußpotenzials sowie die Entwicklung des freien Energieprofils analysiert. Nach 500 ns wurde für beide Zinkfingerpeptide kein Potenzial mehr abgelegt, was auf eine Konvergenz der Simulation hindeutet. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung änderte sich auch die freie Energiefläche nach derselben Simulationszeit nur noch unwesentlich. Zusammenfassend kann also folgende Aussage getroffen werden: *wt*-Metadynamik-Simulationen konnten das Energieprofil des zentralen Phenylalanins im hydrophoben Kern detailliert beschreiben. Während 3YY1 eine Barriere von 17 kJ/mol aufzeigte, konnte durch die Mutation des β -turns mit Hot=Tap eine signifikante Erhöhung auf 30 kJ/mol erreicht werden. Dennoch ist eine schnelle Rotation des Phe¹³ um χ_2 weiterhin möglich, da auch ZFV-1 ein AA'BB'C-Spin-System aufweist. Diese Beobachtungen stimmen mit den Untersuchungen von WÜTHRICH *et al.*^[435] zur Dynamik von aromatischen Aminosäuren im BPTI überein. Sie postulierten für ein Phenylalanin, das bei Raumtemperatur an der Grenze zum ABCDE-Spin-System steht, eine Energiebarriere von 57 kJ/mol. Die Zinkfingervariante-1 liegt noch weit unter dieser Barriere, weshalb eine schnelle Rotation von Phe¹³ erwartet wird.

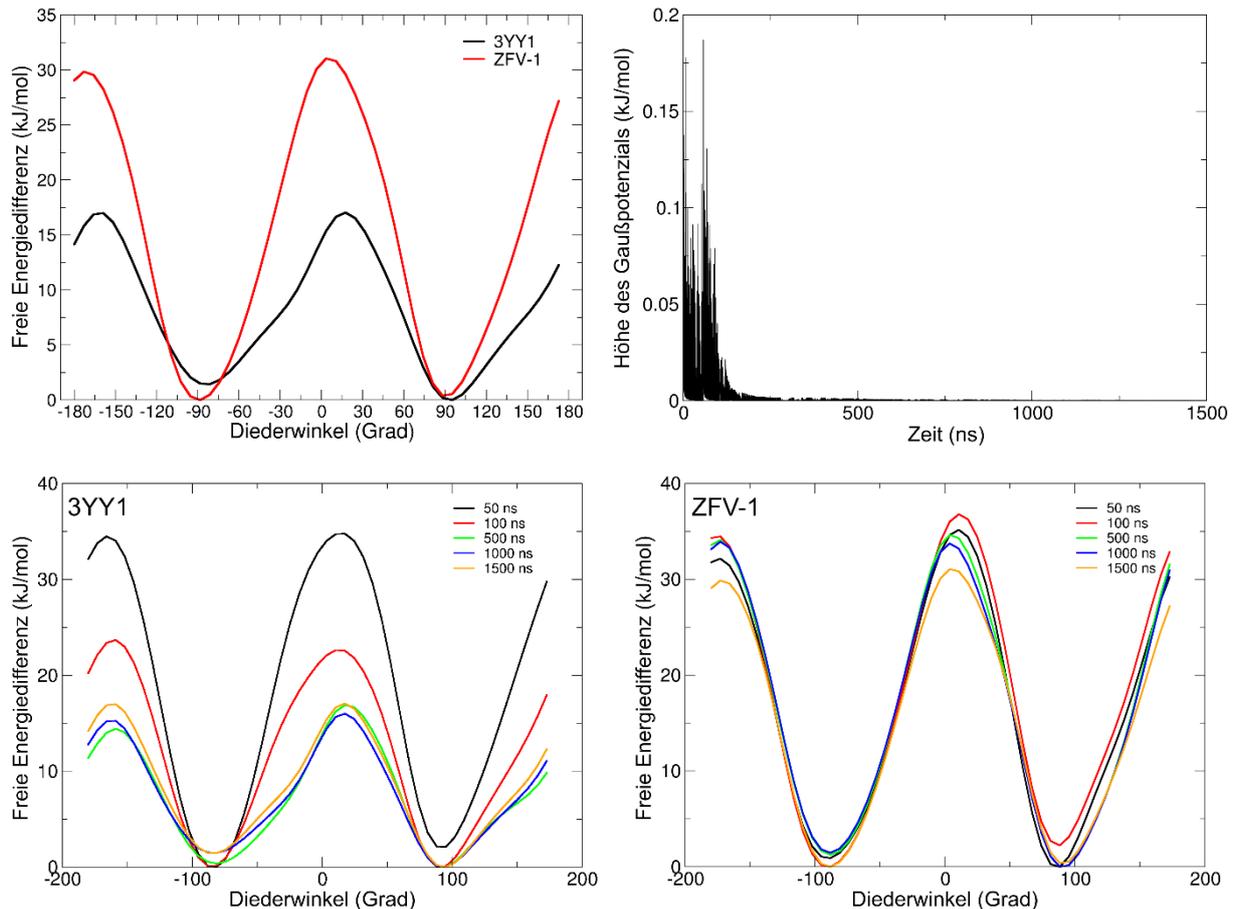


Abbildung 63: Freies Energieprofil des Phe¹³- χ_2 -Diederwinkels (links), der in der *wt*-Metadynamik als kollektive Variable beeinflusst wurde. Die Substitution des β -turns mit Hot=Tap als dipeptidisches *turn*-Mimetikum führte zu einer signifikanten Erhöhung der Rotationsbarriere um χ_2 . Evaluation der Konvergenz der Metadynamik erfolgte durch Analyse des Gaußpotenzials (oben rechts), wobei ein rapides Abfallen nach kurzer Simulationszeit beobachtet wurde. In Übereinstimmung hierzu zeigte die Entwicklung der freien Energieprofile (links unten 3YY1; rechts unten ZFV-1) nach 1000 ns keine Veränderung des Verlaufs, sondern nur noch eine minimale Änderung der absoluten Energiebarriere.

3.2.6 Mechanismus der Rotation von Phe¹³ in Zinkfingerpeptiden

Sowohl in der MD-Simulation von 3YY1 als auch in der *wt*-Metadynamik von ZFV-1 wurde eine Rotation des zentralen Phenylalanins an Position 13, im Zentrum des hydrophoben Kerns, verzeichnet. Die Analyse der Tertiärstruktur hinsichtlich ihrer Kompaktheit zeigt jedoch, dass Phe¹³ von Lys¹¹, Asn¹⁸ und His²² dicht umschlossen ist. Daher wird die Frage aufgeworfen, wie der Bewegungsmechanismus der Rotation abläuft, da eine Änderung von χ_2 sterisch ungünstige Wechselwirkungen der Seitenketten zur Folge hätte. Hierbei können zwei mögliche Abläufe in Erwägung gezogen werden: Phe¹³ könnte zunächst seinen χ_1 -Diederwinkel ändern, woraufhin der Phenylring genügend Raum zur freien Rotation hätte, gefolgt von Wiederherstellung des hydrophoben Kerns. Der zweite denkbare Mechanismus wäre die direkte Rotation im hydrophoben Kern, wobei entweder die α -Helix oder ein β -Strang "ausweichen" müsste, um die Drehung zu ermöglichen. Ebenfalls wäre eine konzertierte Öffnung der Tertiärstruktur plausibel. Jeder dieser Mechanismen erfordert strukturelle Neuarrangements, die zu energetisch

ungünstigen Zuständen führen würden. Die Dislokation des Phe¹³ durch eine Änderung des χ_2 -Diederwinkels würde eine Kluft im hydrophoben Kern entstehen lassen, der eine signifikante thermodynamische Destabilisierung bedeuten würde. Dieser Einfluss konnte durch die Mutation des zentralen Phenylalanins durch Leucin von LACHENMANN *et al.* bestätigt werden.^[156] Hierbei wurde zwar eine $\beta\alpha$ -Faltung erhalten, die jedoch nach einer leichten Erhöhung der Temperatur degradierte. Zudem fehlten spezifische NOE-Kontakte, die eine gepackte Struktur definierten. Die Begründung dafür lag in der Kluft, die Leucin im hydrophoben Kern erzeugte. Hierdurch wurden Fluktuationen der umliegenden Seitenketten verstärkt, die eine destabilisierende Wirkung auf die Struktur ausüben. Einen ähnlichen, oder gar stärkeren Effekt wäre bei der Verschiebung von Phe¹³ aus 3YY1 denkbar, abhängig von der Dauer der Rotation. Der zweite Bewegungsablauf, die unmittelbare Rotation im Zinkfingerzentrum, würde eine Öffnung der Tertiärstruktur erfordern und in energetisch ungünstigen Verzerrungen von Strukturelementen resultieren. Es ist sogar denkbar, dass die Drehbewegung beide Sekundärstrukturelemente, die α -Helix und den β -*hairpin* so weit voneinander entfernt, dass eine Teilentfaltung beobachtet werden könnte. Dem gegenüber steht die enorme Stabilisierung der Metallkoordination durch Cystein und Histidin, die eine Entfaltung durch eine direkte Rotation von Phe¹³ im Kern verhindert. Nachdem zwei denkbare Bewegungsmechanismen postuliert wurden, sollte die Beweisführung der Hypothesen erfolgen. Falls der erste Bewegungsablauf, Dislokation durch χ_1 -Änderung, gefolgt von Rotation um χ_2 mit abschließender Wiederherstellung des hydrophoben Kerns, dominierend stattfindet sollte, dürfte die Umdrehung von Phe¹³ nur außerhalb des $\beta\alpha$ -Strukturmotivs erfolgen. Eine entsprechende Auftragung beider Diederwinkel der Seitenkette sollte diese Abhängigkeit visualisieren können. Die Charakterisierung des zweiten Bewegungsablaufs könnte durch eine ähnliche Methodik erfolgen. Falls eine Drehbewegung innerhalb des hydrophoben Kerns abläuft, müsste bei einer Änderung von χ_2 zeitgleich eine Vergrößerung des Abstands beider Sekundärstrukturelemente zueinander zu beobachten sein. Letztendlich kann durch die Applikation einer weiteren Analysemethode beide Bewegungsmechanismen simultan bewiesen, beziehungsweise widerlegt werden. Das Programm *plumed*^[441] ist in der Lage, sämtliche Strukturen innerhalb einer Trajektorie mit einem, oder mehreren, bestimmten Parameter in eine Datei zur Analyse zusammenzuführen. Dieses Vorgehen stellt einen stark vereinfachten Ansatz des *clusterings* dar.^[442] Diese Methode dient, in Analogie zur Hauptkomponentenanalyse als Reduktion der Dimensionalität einer Trajektorie, die aus einer Moleküldynamik-Simulation gewonnen wurde.^[387] Der Strukturcluster zeichnet ein deutliches Bild, ob der erste oder zweite Bewegungsmechanismus präferiert wird oder gar ein dritter, vorher nicht betrachteter Ablauf bevorzugt wird.

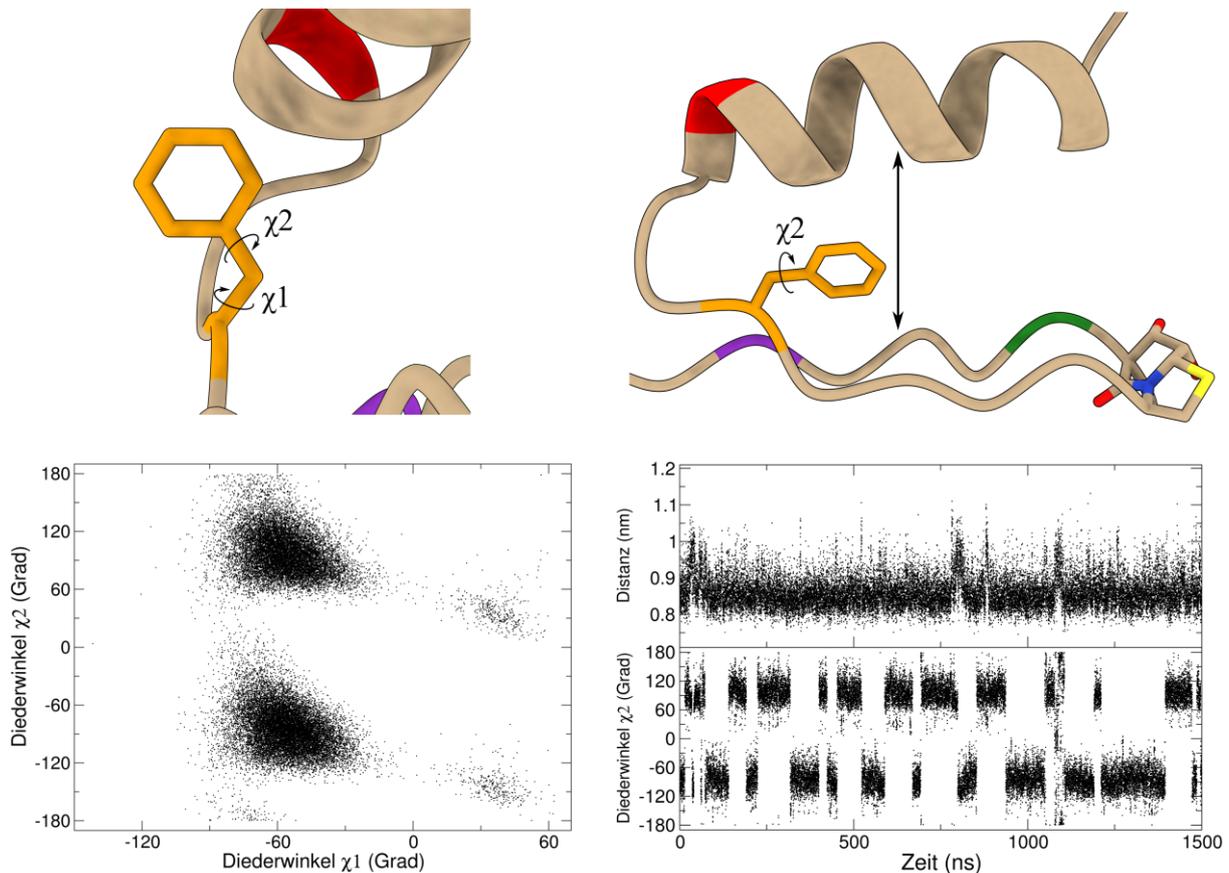


Abbildung 64: Denkbare Rotationsbewegungsmechanismen des zentralen Phenylalanins an Position 13 in der Zinkfingervariante-1. Zunächst könnte die Dislokation des Rings aus dem hydrophoben Kern durch eine Änderung von χ_1 erfolgen, mit anschließender Rotation um χ_2 (oben links). Ein weiterer plausibler Ablauf wäre die direkte Drehung zwischen den Sekundärstrukturelementen, was jedoch die Öffnung der Tertiärstruktur voraussetzen würde (oben rechts). Untere Reihe: Charakterisierung der beiden Bewegungsmechanismen von Phe¹³ durch Auftragung der Diederwinkel χ_1 und χ_2 zueinander (links), sowie Ermittlung von korrelierten Bewegungen von χ_2 und Öffnungsabstand. Die Distanz der Sekundärstrukturelemente wurde definiert aus dem Abstand zweier geometrischer Mittelpunkte ($P1 = Q^3_\alpha$ und R^{12}_ω , sowie $P2 = N^{18}_\omega$, N^{18}_C und L^{19}_N).

Die Ergebnisse aus Abbildung 64 lassen keine eindeutige Identifikation eines Bewegungsablaufs zu. Der erste Mechanismus würde einen χ_1 -Diederwinkel kleiner als -80° erfordern, mit einer anschließenden Änderung um χ_2 . Die Auftragung beider Torsionen demonstrierte, dass diese Bewegungsform jedoch nur sehr selten in der *wt*-Metadynamik abläuft. Im Gegenteil, es gibt sogar eine beachtliche Anzahl an Konformationen, in denen der Phenylring sogar weiter in den hydrophoben Kern verschoben wurde ($\chi_1 = 50^\circ$), was in einer Verdrängung der Seitenkette von Leu¹⁹ resultierte. Die Verschiebung von Phe¹³ würde zu einem signifikanten Loch innerhalb der Tertiärstruktur führen, was energetisch ungünstig ist. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen zur Untersuchung der Dynamik des hydrophoben Kerns von Zinkfingerpeptiden von LACHENMANN *et al.*^[156,157] und SUGIURA *et al.*^[158] überein. Auch die Ergebnisse der Beweisführung zum zweiten Mechanismus, der Rotation von Phe¹³ innerhalb des Zinkfingerzentrums durch eine Aufweitung der Tertiärstruktur, waren unzureichend. Zwar wurde vereinzelt eine konzertierte Änderung beider strukturellen Parameter beobachtet, jedoch zeigt das Distanzprofil der *wt*-Metadynamik eine zu große Ähnlichkeit mit der MD-Simulation, sodass von einer Abhängigkeit nicht ausgegangen werden kann. Vielmehr scheint es, dass

beide Bewegungsformen innerhalb der *wt*-Metadynamik auftreten. Die Untersuchungen der Konformationen, die aus dem *clustering* mit einem χ_2 -Winkelbereich von -5 bis 5° erhalten wurden, enthüllten die Komplexität dieses Bewegungsmechanismus (Abbildung 65). Die Strukturen zeigen keine einheitliche Konformation, sondern spiegeln beide postulierten Bewegungsmuster wider, wobei vermehrt Strukturen beobachtet wurden, die dem zweiten Mechanismus entsprechen. Dies ist nicht nur der Dynamik des hydrophoben Kerns, sondern der gesamten Flexibilität des Zinkfingers geschuldet. Sowohl die α -Helix als auch der β -*hairpin* erlauben durch ihren dynamischen Charakter eine Vielzahl an verschiedenen Verzerrungen in der Sekundärstruktur. Ob diese Fluktuationen einen negativen oder positiven Einfluss auf die thermodynamische Stabilität des Peptids ausüben, ist zentraler Bestandteil des aktuellen wissenschaftlichen Diskurs, wobei vermehrt Proteinsysteme gefunden werden, die durch hochfrequente Bewegungen der Seitenketten eine enorme Stabilität aufweisen.^[443] Diese Schlussfolgerung erklärt zudem, warum Hot=Tap einen so starken Einfluss auf die Energiebarriere der Phe¹³- χ_2 -Rotation ausübt. Eine Erhöhung der Rigidität des β -*hairpins*, schränkt die Bewegungsfreiheit dieses Strukturelements ein, was im Umkehrschluss eine gesteigerte Energiebarriere der Rotation zur Folge hat. Dieser *long-range*-Effekt des *turn*-Mimetikums Hot=Tap wirkt sich somit auch auf die essenzielle Dynamik des Zinkfingerpeptids aus, wobei dennoch eine stabile $\beta\beta\alpha$ -Faltung erhalten werden kann. Es ist hierbei denkbar, dass diese Beobachtung ein Charakteristikum von Hot=Tap ist und somit auch auf andere Miniproteine werden kann. Um diese Hypothese zu validieren, sollten verschiedene Struktur motive mit internen Bewegungen synthetisiert und auf ihre korrelierte Dynamik untersucht werden. Da die Metadynamik eine Simulationsmethode ist und auf Parametern und theoretischen Formalismen beruht, sind die Ergebnisse bezüglich des Rotationsmechanismus mit einer gewissen Vorsicht zu genießen. So besteht die Möglichkeit, dass durch die gezielte Manipulation des χ_2 -Diederwinkels der Zinkfinger in physikalisch unrealistische Bereiche gedrängt werden könnte. Hierzu wurde der *wt*-Zusatz konzipiert, der ein Überfüllen der Minima verhindern sollte. Ein weiteres Indiz für die Glaubwürdigkeit der Ergebnisse ist die Stabilität der Tertiärstruktur während der *wt*-Metadynamik. Um weiterführende Erkenntnisse über die Dynamik des hydrophoben Kerns und der Rotation von Phe¹³ zu erlangen, müssten zusätzliche analytische oder synthetische Experimente durchgeführt werden. Im Rahmen der nachfolgenden Kapitel 3.2.7-3.2.11 werden diese Strategien erläutert.

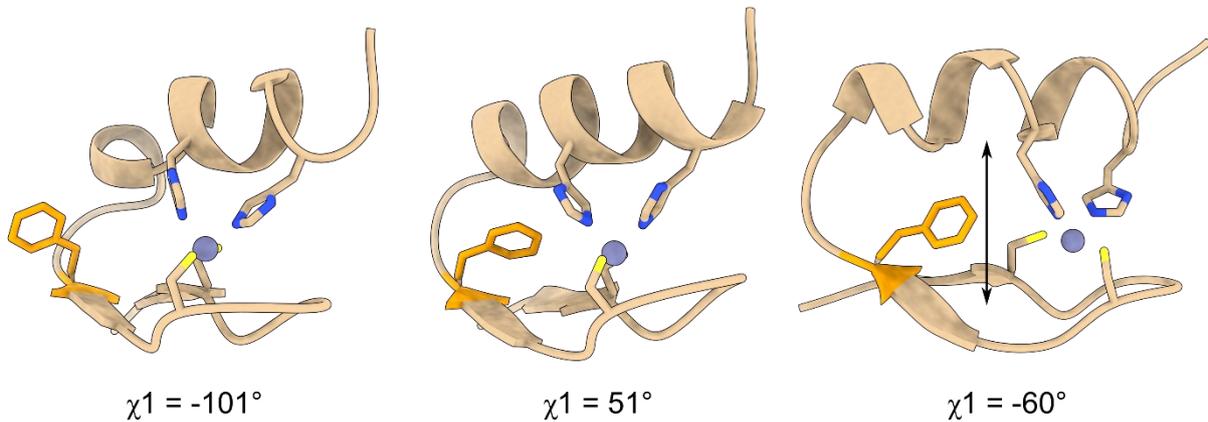


Abbildung 65: Komplexität der Rotationsdynamik von Phe¹³, innerhalb einer *wt*-Metadynamik von Zinkfingerpeptiden. Während der Simulation wurden beide Bewegungsabläufe für die Rotation von Phe¹³ beobachtet. Die Tertiärstruktur erlaubt sowohl eine Drehung außerhalb des hydrophoben Kerns (links, $\chi_1 = -101^\circ$) als auch innerhalb (mittig, $\chi_1 = 51^\circ$). Ebenso wurde eine Rotation bei $\chi_1 = -60^\circ$ beobachtet, die jedoch eine Vergrößerung des Sekundärstrukturabstands voraussetzt (rechts).

3.2.7 Manipulation der Rotationsdynamik durch Modifikationen des hydrophoben Kerns

Die Kombination aus Techniken der NMR-Spektroskopie und Moleküldynamik-Simulationen ermöglichte die detaillierte Beschreibung der Dynamik von Phe¹³ im hydrophoben Kern in Cys₂His₂-Zinkfingerpeptiden, im speziellen den dritten Zinkfinger des Yin Yang1-Proteins.^[250] Um zusätzliche Informationen über die Eigenschaften und Orientierung der zentralen aromatischen Aminosäure zu erhalten, soll nun der Fokus auf Modifizierungen dieser Position gelegt werden. MERRIFIELD *et al.*^[58] ermöglichte durch die Entwicklung der Festphasenpeptidsynthese die gezielte Mutation einzelner Aminosäuren innerhalb einer Peptidsequenz. Mehrere Arbeitsgruppen modifizierten den hydrophoben Kern, indem sie das zentrale Phenylalanin durch natürliche aliphatische Aminosäuren wie Alanin oder Leucin ersetzten.^[156,192] Auch Tyrosin und Histidin wurden bereits in Zinkfingerpeptiden eingebaut, um die Dynamik des hydrophoben Kerns in Abhängigkeit der aromatischen Umgebung zu untersuchen.^[426,444] Um zunächst einen Teil dieser Ergebnisse zu bestätigen und auf das YY1-Protein zu übertragen, wurde Phe¹³ durch Tyr¹³ ersetzt (Abbildung 66).

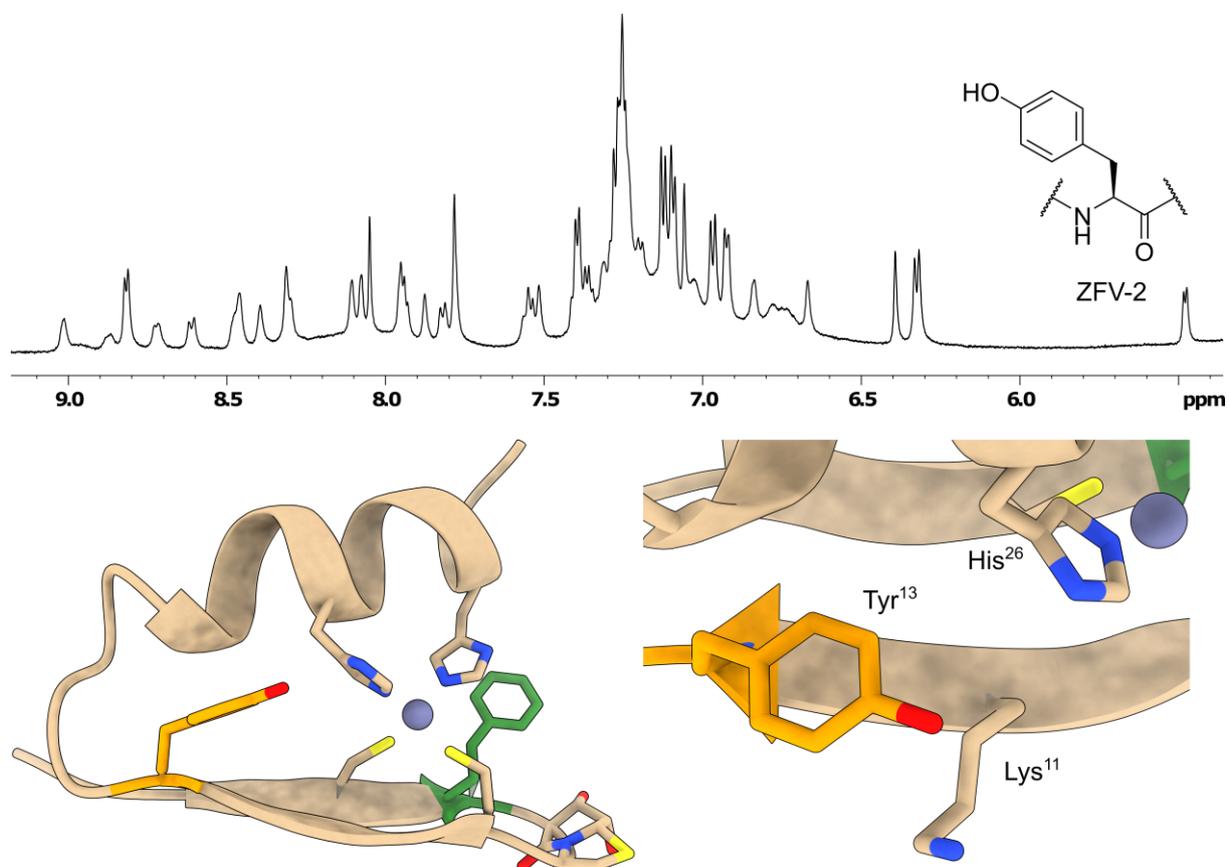


Abbildung 66: Auswirkungen der F13Y-Mutation im ZFV-2. Der Austausch der zentralen Aminosäure im hydrophoben Kern zum Tyrosin führte zu einem Zinkfinger-typischen Signalmuster im ¹H-NMR (oben, 600 MHz, 300 K, H₂O/D₂O 9:1, 1.5 eq Zn²⁺, pH = 5.9) mit minimalen Unterschieden in der chemischen Verschiebung. Ausgehend von den NOE-Kontakten wurde analog zu ZFV-1 eine NMR-Struktur berechnet, die eine starke Ähnlichkeit zum klassischen ββ-Faltungsmotiv aufzeigt. Der größte Unterschied kann auf die Ausrichtung des Tyr¹³ reduziert werden, dessen Hydroxy-Gruppe sich außerhalb des Zinkfingerzentrums befindet und eine Wasserstoffbrücke zum benachbarten Lys¹¹-NH₃⁺ eingeht.

Die Einführung der Hydroxy-Gruppe an der ζ-Position der aromatischen Seitenkette führte zu einem nahezu identischen ββ-Faltungsmotiv (Abbildung 66). Das Signalmuster ermöglichte nicht nur die vollständige Zuordnung durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie, sondern lieferte ausreichend NOE-restraints, um ein einheitliches Strukturensemble zu generieren. Hierbei wird der Unterschied in der Anordnung innerhalb des hydrophoben Kerns deutlich. Durch ungünstige sterische Wechselwirkungen befindet sich die Hydroxy-Funktion an der ζ-Position außerhalb des Zinkfingerzentrums. Hierdurch kann kein vollständiges *edge-to-face-Stacking* erreicht werden, was die thermodynamische Stabilität des Zinkfingers herabsetzt. Der Vergleich der ¹H-NMR-Spektren bei 320 K in Abbildung 67 verdeutlicht die verringerte Stabilität eindrucksvoll. Die Ergebnisse des ZFY-swivel-Zinkfingers von JASANOFF *et al.*^[426] konnten somit auf den dritten Finger des Yin Yang1-Proteins übertragen werden.

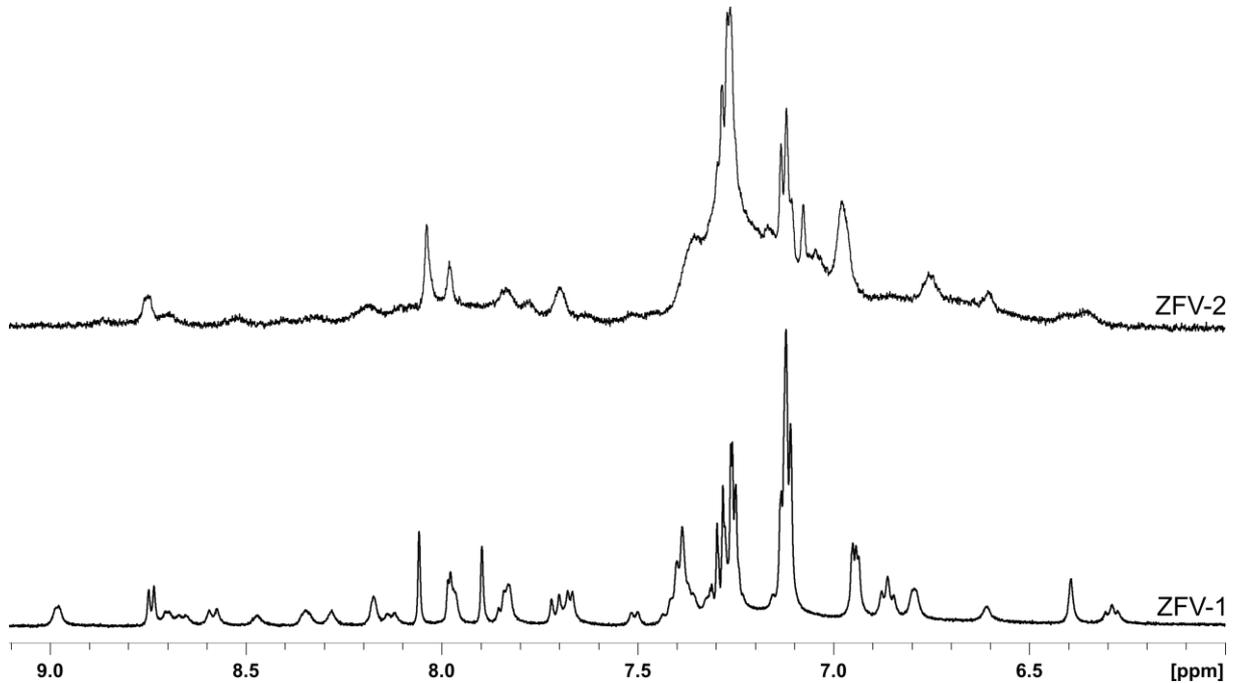


Abbildung 67: Temperaturstabilitätsvergleich zwischen ZFV-1 (Phe¹³, Hot⁷=Tap⁸) und ZFV-2 (Tyr¹³, Hot⁷=Tap⁸). Die Einführung der Hydroxy-Funktion an der ζ-Position von Phe¹³ führt zum ββα-Faltungsmotiv, das gegenüber erhöhten Temperaturen eine verminderte Stabilität demonstriert. ZFV-1: 500 MHz, 320K, H₂O/D₂O 9:1, 1.5 eq Zn⁺², pH = 5.9. ZFV-2: 600 MHz, 320K, H₂O/D₂O 9:1, 1.5 eq Zn⁺², pH = 5.9.

QIAN *et al.* demonstrieren durch die F10H Mutation, dass auch diese Veränderung toleriert wurde, aber mit einem massiven Verlust der thermodynamischen Stabilität einhergeht.^[444] Daher wurde der Fokus nun auf die letzte verbliebene natürliche Aminosäure mit einer aromatischen Seitenkette gelegt - dem Tryptophan. Zwar gibt es Zinkfinger motive, die Tryptophan enthalten, tendenziell ist diese Aminosäure im klassischen Cys₂His₂-Zinkfinger jedoch unterrepräsentiert.^[445] In Analogie zu den bisherigen Synthesen erfolgte somit die Darstellung und Isolierung der entsprechenden Zinkfingervariante-3 mit Tryptophan an Position 13. Während die Charakterisierung der *apo*-Form durch NMR-Spektroskopie den erfolgreichen Einbau der Aminosäure bestätigte (Abbildung 68), führte die Zugabe von 1.5 eq. Zink²⁺ mit anschließender Erhöhung des pH-Werts auf 6.0 zu keiner definierten Struktur. Auch die zusätzliche Steigerung des pH-Werts auf 8.0 resultierte nicht in der Ausbildung der klassischen Zinkfingerstruktur. Stattdessen konnte nur ein extremer Signalverlust beobachtet werden, der auf Aggregationseffekte zurückzuführen ist. Eine mögliche Erklärung liegt in dem sterischen Anspruch der Seitenkette von Trp¹³, die die Faltung des Zinkfingerstrukturmotivs inhibiert. Hierbei kann davon ausgegangen werden, dass zwar eine Zinkbindung durch die Thiolate der Cysteine erfolgt, jedoch eine vollständige Formation der Ligandensphäre um das Zink-Ion durch die Seitenketten der Histidine nicht erreicht werden kann. LI *et al.* untersuchten die metallabhängige Faltung von Cys₂His₂-Zinkfingerpeptiden und enthüllten eine Abhängigkeit zwischen der Ausbildung der vollständigen Zink-Koordinationssphäre und der Anwesenheit eines wohl definierten hydrophoben Kerns.^[115]

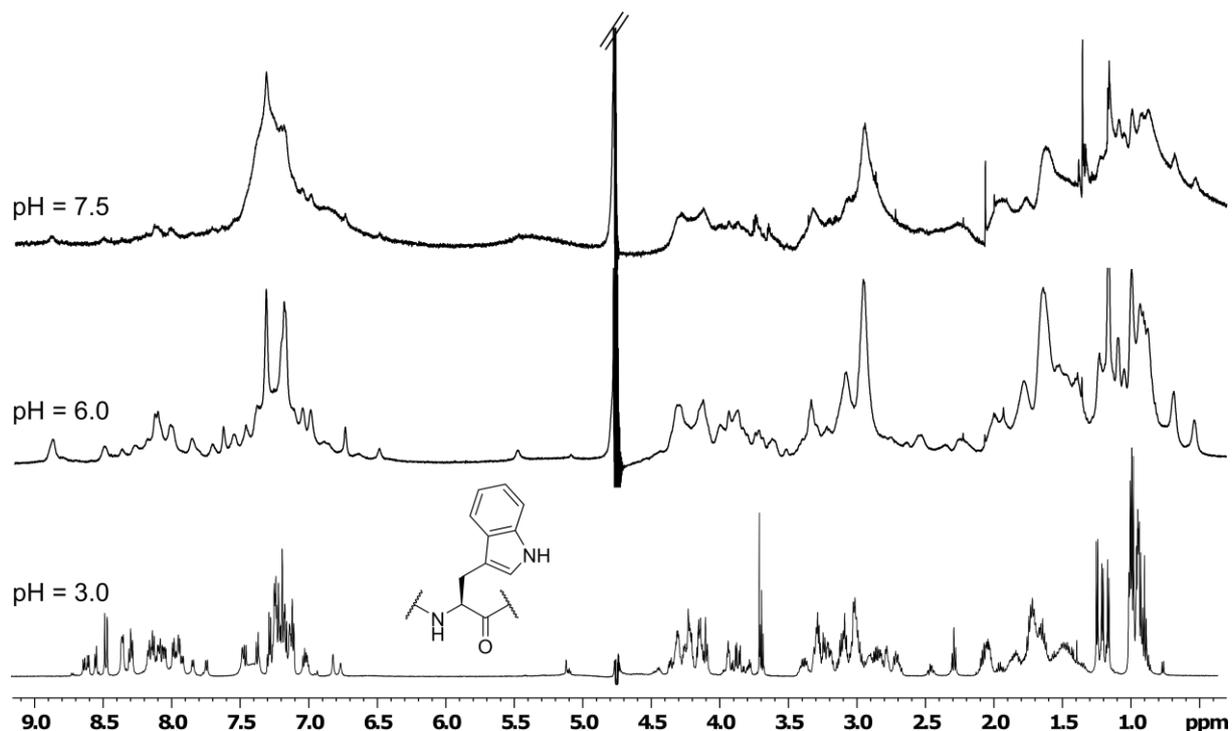


Abbildung 68: Auswirkungen der F13W-Mutation im ZFV-3 auf die Tertiärstruktur des Zinkfingers. Die Festphasenpeptidsynthese, gefolgt von Aufarbeitung mit semipräparativer HPLC lieferte die saubere apo-Verbindung, die durch $\text{Hot}^7=\text{Tap}^8$ bereits eine gewissen Vorfaltung besitzt. Nach Zugabe von 1.5 eq Zn^{2+} und einer Erhöhung auf pH = 6.0 wurden anteilig Zinkfinger-typische Signale verzeichnet, jedoch war die spektroskopische Qualität der Verbindung unzureichend. Die weitere Zugabe von NaOH führte zu Aggregation des Peptids und damit verbundenem Verlust von Signalen. 600 MHz, 300 K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, 1.5 eq Zn^{2+} , der pH = Wert der Proben variierte, wie in der Abbildung angegeben.

3.2.8 Aufbrechen der natürlichen Limitationen durch synthetische Aminosäuren

Die Untersuchungen des vorherigen Kapitels zeigen die Auswirkungen der Substitution von Phe¹³ im hydrophoben Kern des 3YY1-Zinkfingerpeptids mit proteinogenen aromatischen Aminosäuren. Da die Auswahl an natürlichen Bausteinen mit aromatischen Seitenketten stark begrenzt ist, sollte der Einbau von synthetischen Aminosäuren evaluiert werden. Hierdurch könnten zusätzliche Informationen über die Dynamik des hydrophoben Kerns erhalten werden. Im Laufe der Jahre wurden zahlreiche Methode für die Darstellung von neuartigen synthetischen α -Aminosäuren entwickelt, um natürliche Limitationen aufzubrechen.^[446-448] Das Interesse der wissenschaftlichen Gemeinde an Mutation von Peptiden und Proteinen mit diesen unnatürlichen Aminosäuren wuchs stetig, wodurch mittlerweile zahlreiche Derivate kommerziell erhältlich sind. Die Einführung einer Hydroxy-Gruppe an der ζ -Position (Tyrosin) führte zwar zu einer Zinkfingerstruktur, die jedoch eine geringe thermodynamische Stabilität aufwies. Der Grund lag hierbei in der Orientierung des Phenolrings aus dem hydrophoben Kern, wodurch keine *edge-to-face*-Wechselwirkung mit den benachbarten His²² zu beobachten war. Die gezielte Beeinflussung der Konformation von biologischen Makromolekülen durch Halogen-Wechselwirkungen gewinnt in den letzten Jahren zunehmend an Aufmerksamkeit.^[449] Daher erschien es logisch, zunächst den Einfluss dieser Funktionalität im Zinkfingermotiv zu untersuchen, da neben potenziellen

interessanten Wechselwirkungen auch die kommerzielle Verfügbarkeit der jeweiligen aromatischen Halogenide ausgezeichnet ist. Somit wurden *para*-Brom-Phenylalanin und *para*-Iod-Phenylalanin kommerziell erworben und Tyrosin durch eine aromatische Halogenierung in einem Schritt zum *meta*-Di-Brom-Tyrosin umgesetzt. Diese drei Bausteine verfügen über unterschiedliche elektronische und sterische Eigenschaften, wodurch eine Beeinflussung der Zusammensetzung des hydrophoben Kerns im Zinkfingerzentrum erwartet wurde. Der Einbau dieser Derivate resultierte in den entsprechenden Zinkfingervarianten ZFV-4, ZFV-5 und ZFV-6, deren Isolierung durch *rp*-HPLC erfolgte.

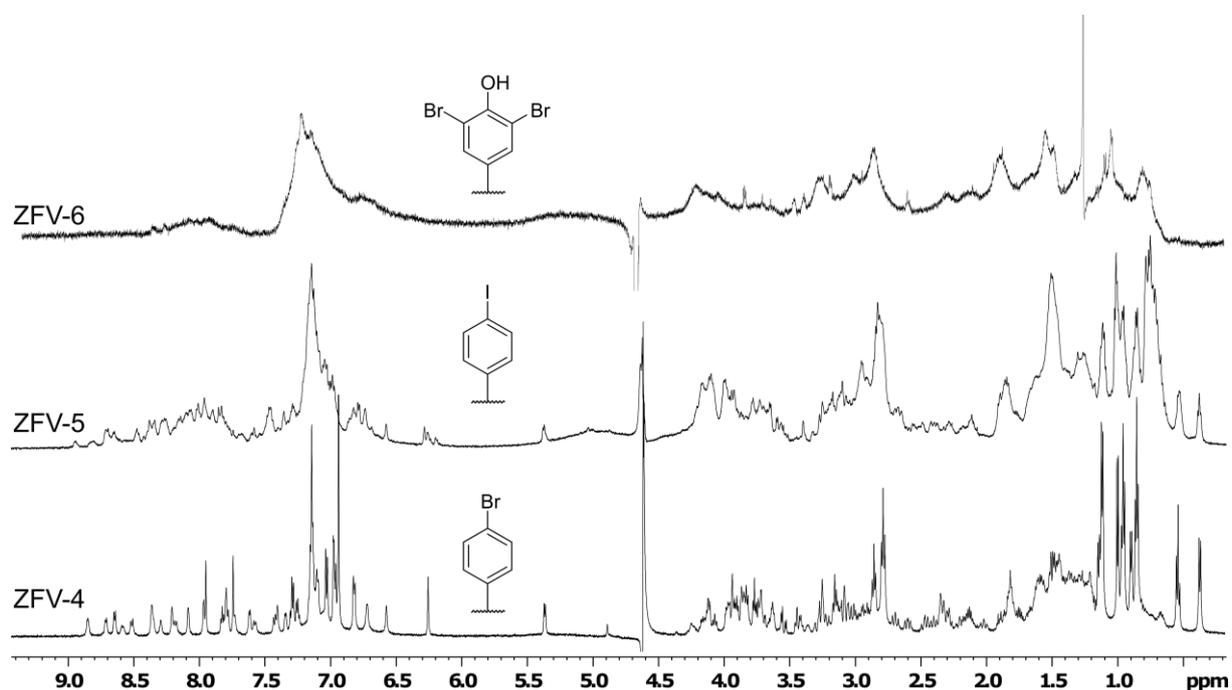


Abbildung 69: Einfluss von unnatürlichen Aminosäuren im hydrophoben Kern auf die Faltung von Zinkfingerpeptiden. *Para*-Brom-Phenylalanin (substituiert für Phe¹³ in ZFV-4) erzeugte ein Signalmuster im ¹H-NMR, das dem klassischen $\beta\alpha$ -Tertiärstrukturmotiv von Zinkfingern entspricht. Die Vergrößerung des sterischen Anspruchs durch *para*-Iod-Phenylalanin (ZFV-5) erlaubte nur eine unvollständige Faltung. Während die vorherigen Bausteine kommerziell erhalten wurden, konnte *meta*-Di-Brom-Tyrosin durch die direkte Bromierung von Tyrosin generiert werden. Diese signifikante Ausdehnung der Seitenkette führte selbst bei höheren pH-Werten zum Verlust von Signalen infolge von Aggregationen. NMR-Bedingungen: 600 MHz, 300 K, H₂O/D₂O 9:1, 1.5 eq Zn²⁺, pH: ZFV-4 = 6.3, ZFV-5 = 5.9, ZFV-6 = 6.5.

Abbildung 69 demonstriert eindringlich die Auswirkungen, die ein erhöhter sterischer Anspruch in *para*-Position des zentralen Phenylalanins auf das Faltungsvermögens des Zinkfingers ausübt. Zwar besitzt Brom einen größeren VAN-DER-WAALS-Radius als Sauerstoff (185 pm vs. 152 pm),^[450] dennoch ist ZFV-4 in der Lage, das $\beta\alpha$ -Motiv auszubilden, was durch charakteristische Verschiebungen im ¹H-NMR-Spektrum und dem TOCSY/NOESY-Muster bestätigt wurde. Die Grenze der Toleranz für Substitutionen an der *para*-Position wird beim Zinkfingerpeptid ZFV-5 deutlich. Durch die erneute Expansion des VAN-DER-WAALS-Radius auf 198 pm,^[450] ist das Zinkfingerpeptid nicht in der Lage, einen stabilen hydrophoben Kern auszubilden. Zwar kennzeichnen typische Verschiebungen im ¹H-Spektrum eine Teilfaltung zum Cys₂His₂-Zinkfingermotiv, die selbst durch eine Erhöhung des pH-Werts nicht vollständig stabilisiert werden konnte. Die symmetrische Substitution der *meta*-Position in ZFV-6 verhinderte die Ausbildung der Tertiärstruktur nahezu vollständig und demonstriert die Bedeutung der

Zusammensetzung des hydrophoben Kerns für die Faltungstabilität von Zinkfingerpeptiden. Zusätzlich wurde bei erhöhten pH-Wert, in Analogie zu ZFV-3 die Entstehung von Aggregaten beobachtet, die den Verlust des Signal-Rausch-Verhältnis herbeiführten. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der dritte Zinkfinger des Yin Yang1-Proteins 3YY1, eine gewisse Toleranz gegenüber Substitutionen der *para*-Position von Phe¹³ im hydrophoben Kern aufweist. Im Gegensatz dazu resultiert die simultane Expansion der *meta*- und *para*-Positionen in einem Unvermögen, in Gegenwart von Zink das $\beta\alpha$ -Strukturmotiv auszubilden. In dem schmalen Stabilitätsbereich, der dem Zinkfingerpeptid zur Verfügung steht, verursachte jegliche bisher betrachtete Mutation, natürlicher oder unnatürlicher Natur, entweder eine leichte Destabilisierung oder führte zur Unfähigkeit das entsprechende Strukturmotiv darzustellen. Häufig wurde eine so große Änderung in der Struktur erzielt, dass die Ergebnisse nicht systematisch interpretierbar waren. Diese Erkenntnisse motivierten die Darstellung von weiteren Bausteinen, die genau diese systematische Charakterisierung des hydrophoben Kerns und seiner Dynamik ermöglichen. Die Anforderungen, die diese Bausteine mitbringen müssen, sind in Abbildung 70 zusammengefasst.

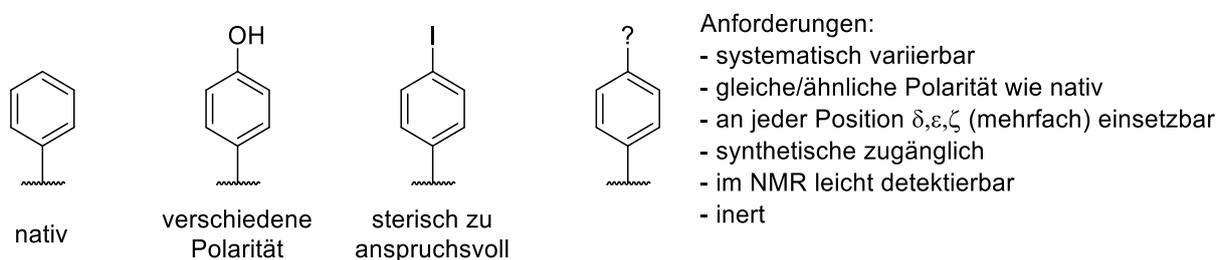
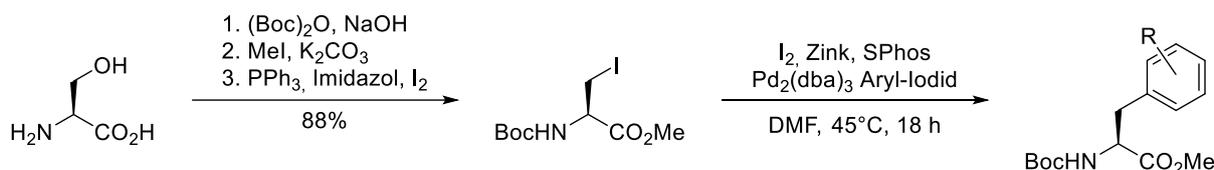


Abbildung 70: Zusammenfassung der Anforderungen an die Funktionalität eines Phenylalaninderivats, das für die Charakterisierung der korrelierten Dynamik in Zinkfingerpeptiden eingesetzt werden soll.

Im Bereich der Synthese von Aminosäurederivaten mit aromatischen Seitenketten etablierte sich die Verwendung von Palladium-katalysierten Kreuzkupplungen.^[451] Innerhalb dieser Arbeit wurde die vielseitige NEGISHI-Kreuzkupplung verwendet, die sp^2 - sp^3 -Verknüpfungen, ausgehend von leicht darstellbaren Edukten ermöglicht.^[452] ROSS *et al.* optimierten dabei die Bedingungen in Bezug auf eine effiziente Kreuzkupplung von Boc-Iod-Ala-OMe mit Aryliodiden zu den entsprechenden Phenylalaninderivaten (Schema 1).^[453] Durch die Flexibilität der Aryliodide können eine Vielzahl an Funktionalitäten in das Grundgerüst einer Aminosäure eingeführt werden.



Schema 1: Darstellung von Phenylalaninderivaten ausgehend von L-Serin mit einer NEGISHI-Reaktion als Schlüsselschritt. Zunächst erfolgte in drei Stufen die Synthese des Boc-Iod-Ala-OMe, welches in Grammaßstab im Tiefkühler über mehrere Monate stabil war. Anschließend konnte durch Variation des Aryl-Iodids verschiedene Funktionalitäten mit guter bis exzellenter Ausbeute in die Aminosäureumgebung eingeführt werden.

Insgesamt stellten sich die von ROSS *et al.*^[453] angepassten Bedingungen der NEGISHI-Methode als optimale Synthesestrategie für modifizierte Phenylalaninderivate heraus, da der Baustein in wenigen Stufen zugänglich war, die Reaktion in guten bis exzellenten Ausbeuten ablief und es nur zwei weitere Reaktionsschritte benötigte, um den Fmoc-geschützten *building block* für die Festphasenpeptidsynthese zu erhalten. Im Detail erfolgte zunächst die Darstellung von Boc-Iod-Ala-OMe nach ATMURI *et al.*^[454] Ausgehend von L-Serin wurde das N-terminalen Carbamat mit Bocanhydrid generiert. Anschließend wurde selektiv die Carbonsäure zum entsprechenden Methylester durch Zugabe von Methyljodid im basischen Milieu funktionalisiert, gefolgt von einer Redoxkondensation nach MUKAIYAMA mit Triphenylphosphin und Iod.^[455] Der letzte Aufarbeitungsschritt dieser dreistufigen Synthese enthielt die klassische säulenchromatographische Reinigung über Silicagel. Da diese stationäre Phase eine gewisse Acidität besitzt, wurde die β -H-Eliminierung von Iodwasserstoff zum entsprechenden Boc-Dehydroalanin-OMe katalysiert, das zu einem geringen Prozentteil durch NMR-Spektroskopie im Produkt nachgewiesen werden konnte (Abbildung 71). Da diese Verunreinigung in diesen Mengen keine Auswirkungen auf die Effektivität der NEGISHI-Kreuzkupplung ausübt, wurden bis zu 5% Verunreinigung akzeptiert. Die Gegenwart von Feuchtigkeit, Raumtemperatur und Sonnenlicht erhöhten die Reaktionsgeschwindigkeit der β -H-Eliminierung zum Alken, weshalb Boc-Iod-Ala-OMe im Tiefkühler gelagert wurde. Unter diesen Bedingungen konnte selbst nach mehreren Monaten keine signifikante Zersetzung des Produkts festgestellt werden.

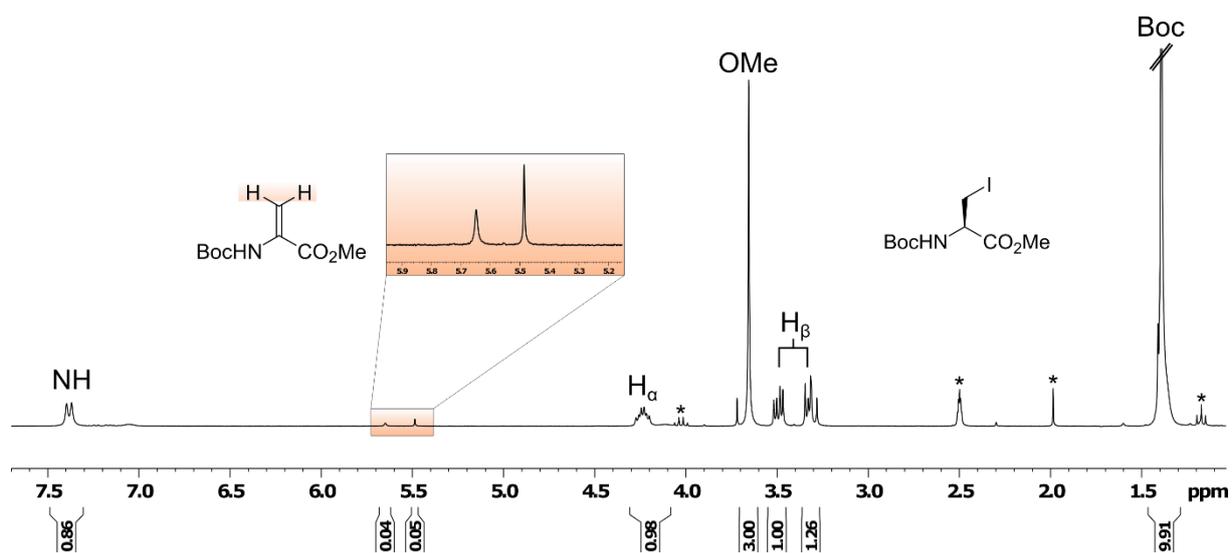


Abbildung 71: ¹H-NMR-Spektrum von Boc-Iod-Ala-OMe, welches ein Schlüsseleddukt für die NEGISHI-Kreuzkupplung darstellt. Die finale Aufarbeitung erfolgte über Säulenchromatographie mit Silicagel als stationäre Phase. Diese leicht-sauren Rahmenbedingungen katalysieren die β -H-Eliminierung von Iodwasserstoff zum Boc-Dehydro-Ala-OMe, dessen am *sp*²-hybridisierten Kohlenstoff gebundenen Protonen eine signifikante Verschiebung bei 5.6 ppm aufzeigen (orange).

Die anschließende NEGISHI-Reaktion wurde nach den Bedingungen von ROSS *et al.* unter einer Argon-Atmosphäre durchgeführt.^[453] Das Präterieren dieser Schutzgasatmosphäre hatte jedoch nur geringe Auswirkungen auf die Ausbeute der Reaktion. Diese Toleranz gegenüber Veränderungen spiegelte sich auch in der Auswahl der Aryliodide wider (Abbildung 72). Das Ziel der Modifikation der Seitenkette

von Phenylalanin war es, die Symmetrie der Rotation des aromatischen Rings um χ^2 zu brechen, wodurch zusätzliche Informationen über die Orientierung erhalten werden sollten. Weiterhin würde eine Vergrößerung des sterischen Anspruchs in einer Erhöhung der Energiebarriere resultieren. Ausgehend von den Kriterien in Abbildung 70 erschien somit die Modifikation durch aliphatische Gruppen zunächst als zielführend, da der sterische Anspruch gezielt gesteigert werden kann und der aliphatische Rest gegenüber den Kupplungsbedingungen der Festphasenpeptidsynthese inert ist. Ein weiterer Vorteil liegt in der Verfügbarkeit der Aryliodide, die in verschiedensten Reinheitsgraden günstig kommerziell erhältlich sind. Sollte der Preis des Reagenzes ein gewisse Grenze überschreiten, beziehungsweise die Verfügbarkeit eingeschränkt sein, kann das Aryliodid in einer SANDMEYER-Reaktion^[456] aus dem entsprechenden Anilin-Derivat dargestellt werden. Weiterhin ist kann die aliphatische Modifikation direkt durch ¹H-NMR-Spektroskopie charakterisiert werden.

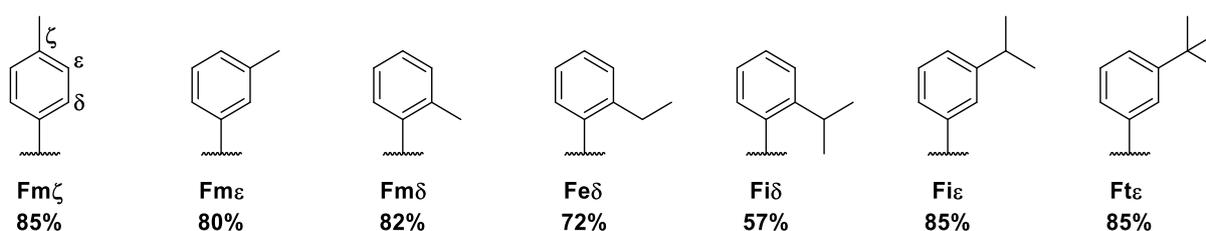


Abbildung 72: *Synthetic scope* der NEGISHI-Reaktion mit einfachen aliphatischen Modifikationen. Sämtliche Derivate wurden in guten bis sehr guten Ausbeuten erhalten. Die Systematik dieser Substitutionen erlaubt eine definierte Nomenklatur gemäß des Dreibuchstaben-Codes, basierend auf dem Grundgerüst, der Art der Modifikation und der Position.

Wie Abbildung 72 zusammenfasst, konnten die sieben Derivate in guten bis hervorragenden Ausbeuten erhalten werden. Hervorzuheben ist hierbei das Potenzial der NEGISHI-Reaktion, sterisch anspruchsvolle Funktionalitäten in *ortho*-Position in das Grundgerüst der Aminosäure einzuführen, ohne einen zu starken Verlust der Ausbeute in Kauf nehmen zu müssen. Wie bei jeder neuen unnatürlichen Aminosäure ist es wünschenswert, eine Nomenklatur gemäß des Dreibuchstaben-Codes zur präzisen und schnellen Identifikation des Bausteins zu definieren. Ausgehend vom Grundgerüst, dem Phenylalanin, fiel die Wahl des ersten Zeichens gemäß dem Einbuchstaben-Code auf F. Anschließend folgt die Art der aliphatischen Modifikation, wobei *m* für Methyl, *e* für Ethyl, *i* für *iso*-Propyl und *t* für *tert*-Butyl denkbar sind. Da die Positionen des Phenylrings ausgehend von dem Aminosäurekorpus nummeriert sind, ergibt sich als letzter Buchstabe die Position der Modifikation mit δ , ϵ oder ζ . Somit konnte zum Beispiel durch die Verwendung von 4-Iod-Toluol in der NEGISHI-Kreuzkupplung der entsprechende Fm ζ -Baustein erhalten werden.

3.2.9 Systematisches Methyl-Hopping am Phe¹³ in Zinkfingerpeptiden - ϵ oder ζ ?

Im vorangegangenen Kapitel wurde die Synthese von Phenylalaninderivaten mit einer aliphatischen Modifikation des aromatischen Rings beschrieben. Ausgehend von optimierten NEGISHI-Kreuzkupplungsbedingungen^[453] konnten sieben Bausteine für die Fmoc-Festphasenpeptidsynthese

dargestellt werden. In diesem Abschnitt soll nun die Orientierung und Rotationsdynamik dieser Derivate im hydrophoben Kern von 3YY1-Zinkfingerpeptiden untersucht werden. Der Einbau der Fmoc-geschützten *building blocks* erfolgte ohne Modifikation der Standard-Bedingungen in der Festphasenpeptidsynthese und lieferte, nach Aufarbeitung mit semipräparativer *rp*-HPLC die entsprechenden Zinkfingervarianten. Zunächst soll hierbei der Fokus auf Fmζ gelegt werden, der zwar eine große Ähnlichkeit mit den bisher betrachteten unnatürlichen Derivaten aufzeigt, dessen Charakterisierung jedoch zur systematischen Analyse der Dynamik des hydrophoben Kerns erforderlich ist. Die NMR-spektroskopische Aufklärung der *apo*-Verbindung bestätigte den vollständigen Einbau der unnatürlichen Aminosäure. Interessanterweise wurde jedoch, nach Zugabe von Zink²⁺ sowie Erhöhung des pH-Werts auf 6.2 nur eine Teilfaltung beobachtet. Im Vergleich zu ZFV-5 konnten jedoch Signale sowohl für die gefaltete als auch für die ungefaltete Struktur verzeichnet werden. Eine erneute Steigerung des pH-Werts auf 7.4 führte im Gegensatz zu ZFV-5 nicht zur Aggregation, sondern zur Ausbildung eines einheitlichen Strukturmotivs. Zweidimensionale NMR-Spektroskopie enthüllte gemäß den Erwartungen ein AA'BB'-Spin-System durch eine schnelle Rotation von Fmζ¹³ um χ_2 . NMR-Strukturberechnungen anhand von NOE-Kontakten resultierten in einer Konformation, die eine große Similarität zu ZFV-2 (Tyr¹³) aufwies, sowohl in der Tertiärstruktur als auch in der Ausrichtung des ζ-Substituenten außerhalb des hydrophoben Kerns (Abbildung 73). Der Übergang von der Hydroxy-Funktionalität zur Methylgruppe enthält einen weiteren Vorteil bezüglich der NMR-spektroskopischen Charakterisierung. Während Ersteres aufgrund ihrer Acidität unter den gegebenen Faltungsbedingungen bereitwillig mit dem Lösungsmittel austauscht und damit signifikant verbreitert, liefert die Methylgruppe eine klar definiertes Singulett, unabhängig vom pH-Wert. Dieser Effekt kann auf die NOESY-Spektroskopie übertragen werden, wodurch wertvolle Informationen über die Orientierung der aromatischen Seitenkette erhalten werden können. Im Fall der Zinkfingervariante-7, konnten ausschließlich NOE-Kontakten der ζ-Methylgruppe zur Seitenkette von K¹¹ beobachtet werden, wodurch auf eine Orientierung außerhalb des hydrophoben Kerns geschlossen wurde. Für die NMR-Strukturberechnungen wurden sämtliche Parameter der aliphatisch modifizierte Phenylalanine mit Hilfe von *Charmm-gui*^[433] erstellt und anschließend auf das *eefx2*-Kraftfeld übertragen.^[402] Der Einsatz von Fmζ vervollständigte die Erkenntnisse über die Auswirkungen der *para*-Substitution am Phe¹³ gegenüber der Stabilität von Zinkfingerpeptiden. Zwar wurden signifikante Änderungen dieser Position toleriert, jedoch resultierten sämtliche Modifikationen in einer verringerten thermodynamischen Stabilität, was anhand des Signalverlusts der ¹H-Spektren bei 320 K in Abbildung 73 ersichtlich ist. Weiterhin besteht die Notwendigkeit der Erhöhung des pH-Werts, um eine vollständige Faltung zum ββ-Strukturmotiv zu ermöglichen. Der Grund liegt hierbei in den strikten geometrischen Restriktionen, die durch die Tertiärstruktur auferlegt werden. In den nativen Sequenzen ist eine Ausbildung einer *edge-to-face* Wechselwirkung des ζ-Protons von Phe¹³ mit dem Imidazol von His²² möglich, wodurch diese stark abgeschirmt werden. Das Blockieren der ζ-Position führt nicht nur zum Verlust dieser stabilisierenden Wechselwirkung, sondern im schlimmsten Fall zur Vereitlung der Tertiärstruktur.

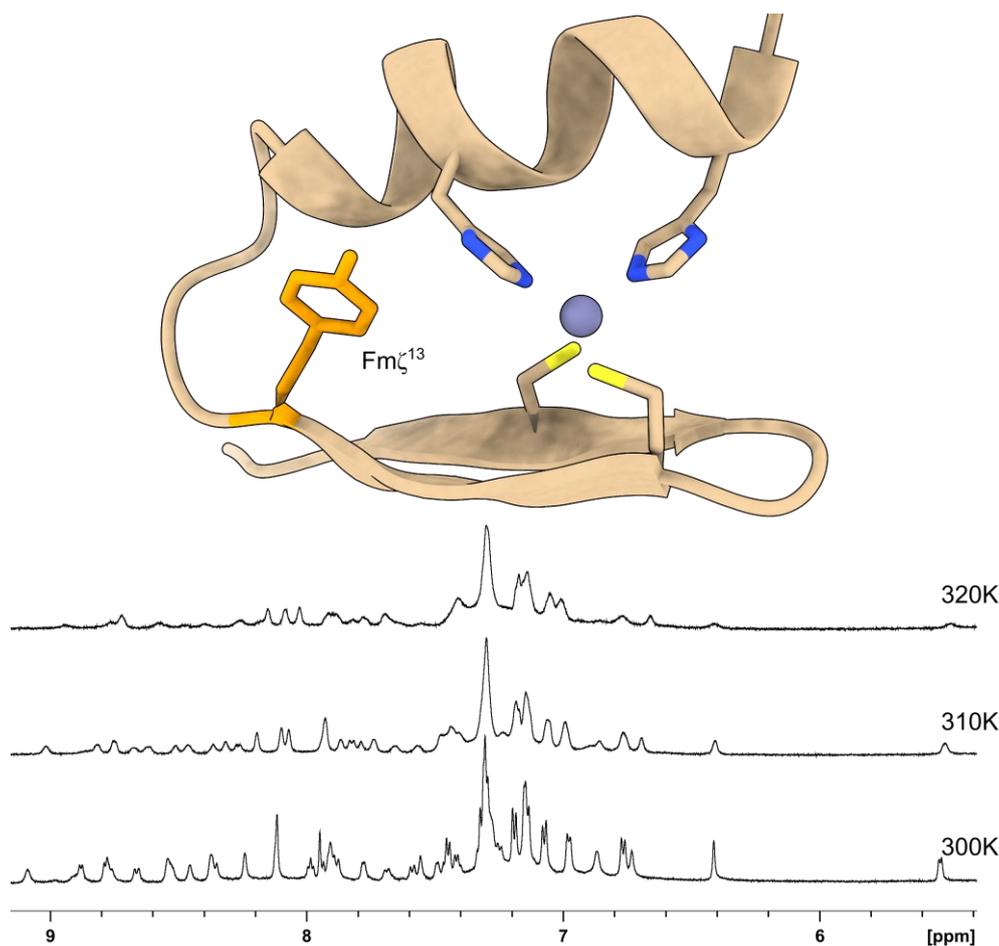


Abbildung 73: Strukturelle Eigenschaften der Zinkfingervariante-7. Oben: Dreidimensionales Abbild des energie-niedrigsten Konformers, das aus der NMR-Strukturberechnung erhalten wurde. Die benötigten *restraints* wurden aus dem NOESY-Spektrum extrahiert. Durch den Einbau von Fm ζ kann keine *edge-to-face*-Wechselwirkung mit dem benachbarten Imidazol von His²² eingegangen werden, wodurch die thermodynamische Stabilität des Zinkfingerpeptids verringert wird. Diese Beobachtung konnte durch Temperaturreihen belegt werden (unten). ¹H-NMR-Bedingungen: 600 MHz, H₂O/D₂O 9:1, 1.5 eq. Zn²⁺, pH = 7.4, Temperatur wie angegeben.

Wie bereits in Kapitel 3.2.1 aufgeführt, zeigten Relaxationsmessungen von WRIGHT *et al.* zwar einen großen Ordnungsparameter, dennoch konnte durch 2D-Spektroskopie das AA'BB'C-Spin-System identifiziert werden.^[227] Die asymmetrische Modifikation der δ - oder ϵ -Position müsste, im Gegensatz zur vorherigen untersuchten ζ -Substitution, einen deutlichen Einfluss auf die Rotationsgeschwindigkeit von Phe¹³ ausüben. Weiterhin könnte die Aufhebung der Symmetrie um χ_2 die Rotation so stark verlangsamen, dass die daraus resultierenden spezifischen NOE-Kontakte eine präzise Charakterisierung der Orientierung der aromatischen Seitenkette ermöglichen würden. Im Folgenden soll zunächst die Fm ϵ ¹³-Zinkfingervariante (ZFV-8) beschrieben werden, da durch die Einführung der Methylgruppe an dieser Position die eindeutigsten Ergebnisse erzielt wurden. Während in der "nativen" Sequenz von ZFV-1 im TOCSY/NOESY-Spektrum nur drei Signale für die Protonen der aromatischen Seitenkette von Phe¹³ beobachtet wurden, führte Fm ϵ ¹³ zu vier aromatischen Signalen und einem Signal für die Methylgruppe, die eine hohe Dispersion zueinander aufzeigen. Zudem konnte im Gegensatz zu den bisherigen Modifikationen des hydrophoben Kerns, kein Verlust der thermodynamischen Stabilität beobachtet werden. Selbst bei 320 K wies ZFV-8 noch gut definierte Signale mit einem exzellenten

Signal-Rausch-Verhältnis auf (Abbildung 74). Die Methylgruppe an der ε-Position ermöglicht die Ausbildung der *edge-to-face*-Wechselwirkung des ζ-Protons und schirmt dieses zusätzlich ab, was durch die chemische Verschiebung von 6.00 ppm im ¹H-NMR belegt wird. Die separierten Signale, gepaart mit der guten Löslichkeit und thermodynamischen Stabilität ermöglichten die vollständige Zuordnung des Peptids mit Hilfe von zweidimensionaler NMR-Spektroskopie, trotz der beachtlichen Größe von 28 Aminosäuren. Die Auswertung des NOESY-Spektrums resultierte in 177 *restraints* für die Berechnung eines NMR-Strukturensembles. Letzteres enthüllte das βα-Faltungsmotiv mit einem kompakten hydrophoben Kern und einer Ausrichtung der ε-Methylgruppe des Fmε¹³ außerhalb des Zinkfingerzentrums zum Lösungsmittel. Die hohe Signaldispersion von Fmε¹³ ermöglichte es, jedem Proton der Seitenkette die NOE-Kontakte zuzuordnen und dadurch die Beschaffenheit des hydrophoben Kerns zu erfassen.

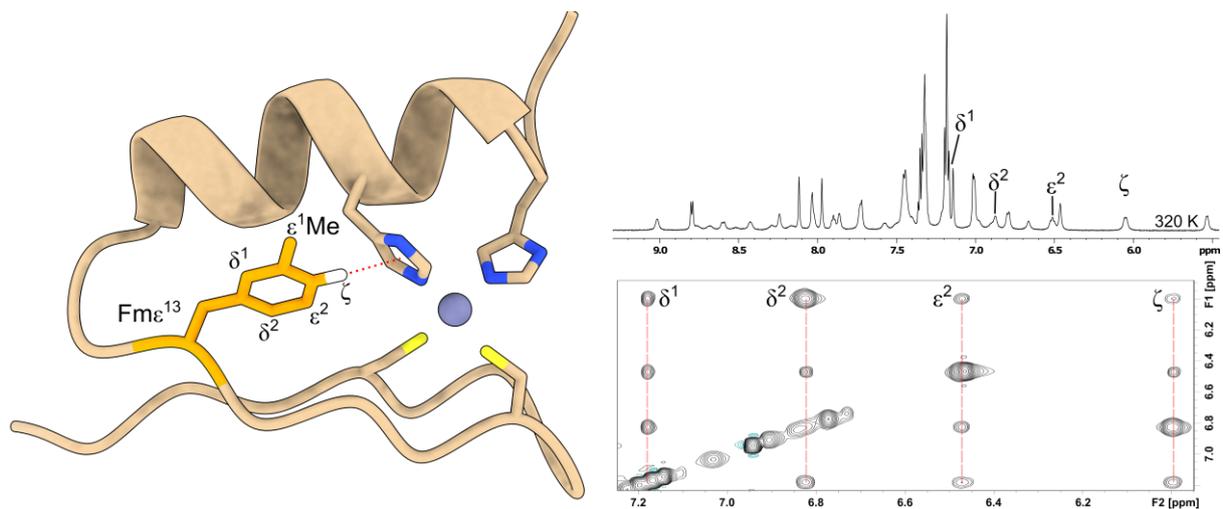


Abbildung 74: Links: Dreidimensionale Darstellung von ZFV-8, berechnet anhand von *restraints*, die durch Integration der NOE-Kreuzsignale generiert wurden. Zur besseren Übersicht wurden nur die Seitenketten der Zinkbindenden Aminosäuren und Fmε¹³ explizit dargestellt. Bis auf das ζ-Proton von Fmε¹³, das eine *edge-to-face*-Wechselwirkung mit dem Imidazol von His²² eingeht, wurden sämtliche Wasserstoffatome entfernt. Die Temperaturstabilität dieser Zinkfingervariante konnte durch das ¹H-Spektrum bei 320 K belegt werden, wobei die aromatischen Protonen ein exzellentes Signal-Rausch-Verhältnis aufzeigen (rechts oben). Die asymmetrische Modifikation mit einer Methylgruppe führt zum Aufspalten der Signale durch Symmetriebruch mit einer guten Dispersion von 1.19 ppm im TOCSY-NMR-Spektrum (rechts unten). NMR-Bedingungen: 600 MHz, H₂O/D₂O 9:1, 290 K, 1.5 eq. Zn²⁺, pH = 6.8.

Während der strukturellen Aufklärung von ZFV-8 durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie wurden Kreuzsignale beobachtet, die dem Strukturmotiv aus Abbildung 74 zunächst nicht zugeordnet werden konnten. So zeigt Fmε¹³εMe einen Kontakt zum C⁴NH (Abbildung 75 rechts unten). Die Aufnahme von Temperaturreihen, sowie der Vergleich mit weiteren Zinkfingerderivaten enthüllten jedoch, dass Fmε¹³εMe zufällig mit dem Val²³β-Proton überlappt. Zwar befindet sich die Seitenkette von Val²³ in der NMR-Struktur in einer Entfernung von ca. 9.3 Å zum C⁴NH-Proton, was die alleinige Intensität des Signals widerlegen würde, dennoch könnten dynamische Translationen stattfinden, die eine Annäherung der Seitenketten ermöglichen. Daher ist eine eindeutige Zuordnung bezüglich der zweiten Orientierung der aromatischen Seitenkette allein durch diesen Kontakt nicht durchzuführen.

Generell ist die exakte Identifikation mit einigen Hürden verbunden, da die Rotation des Phenylrings um χ^2 durch den sterischen Anspruch von $\text{Fm}\epsilon^{13}\epsilon\text{Me}$ eine andere Zusammensetzung der Seitenketten von $\text{Phe}^2/\text{Leu}^{19}$ und Val^{23} erfordern würde. Somit ist selbst der Vergleich der beiden positionsäquivalenten Protonen δ^1 und δ^2 nicht vollends aussagekräftig. An der Grenze des Signal-Rausch-Verhältnis wurden dennoch Kontakte von δ^1 zu der Seitenkette von Leu^{19} beobachtet. Daher kann mit einer gewissen Sicherheit davon ausgegangen werden, dass zu einem geringen Prozentteil eine zweite Konformation in Lösung vorliegt, in der $\text{Fm}\epsilon^{13}\epsilon\text{Me}$ nach Innen ausgerichtet ist. Um eine qualitative Aussage über das Verhältnis des Gleichgewichts treffen zu können, erfolgte die Integration dieser Signale, die eine Abschätzung von 95/5 erlaubten. Eine Möglichkeit, die Charakterisierung des Konformeranteils zu präzisieren, wäre die Mutation von Val^{23} zu Alanin oder Glycin, wodurch irreführende Kreuzsignale eliminiert werden könnten. Weiterhin wäre die gezielte Deuterierung von einzelnen Protonen denkbar, wodurch strukturelle Änderungen minimiert würden und dennoch störende Signale unterdrückt werden könnten.

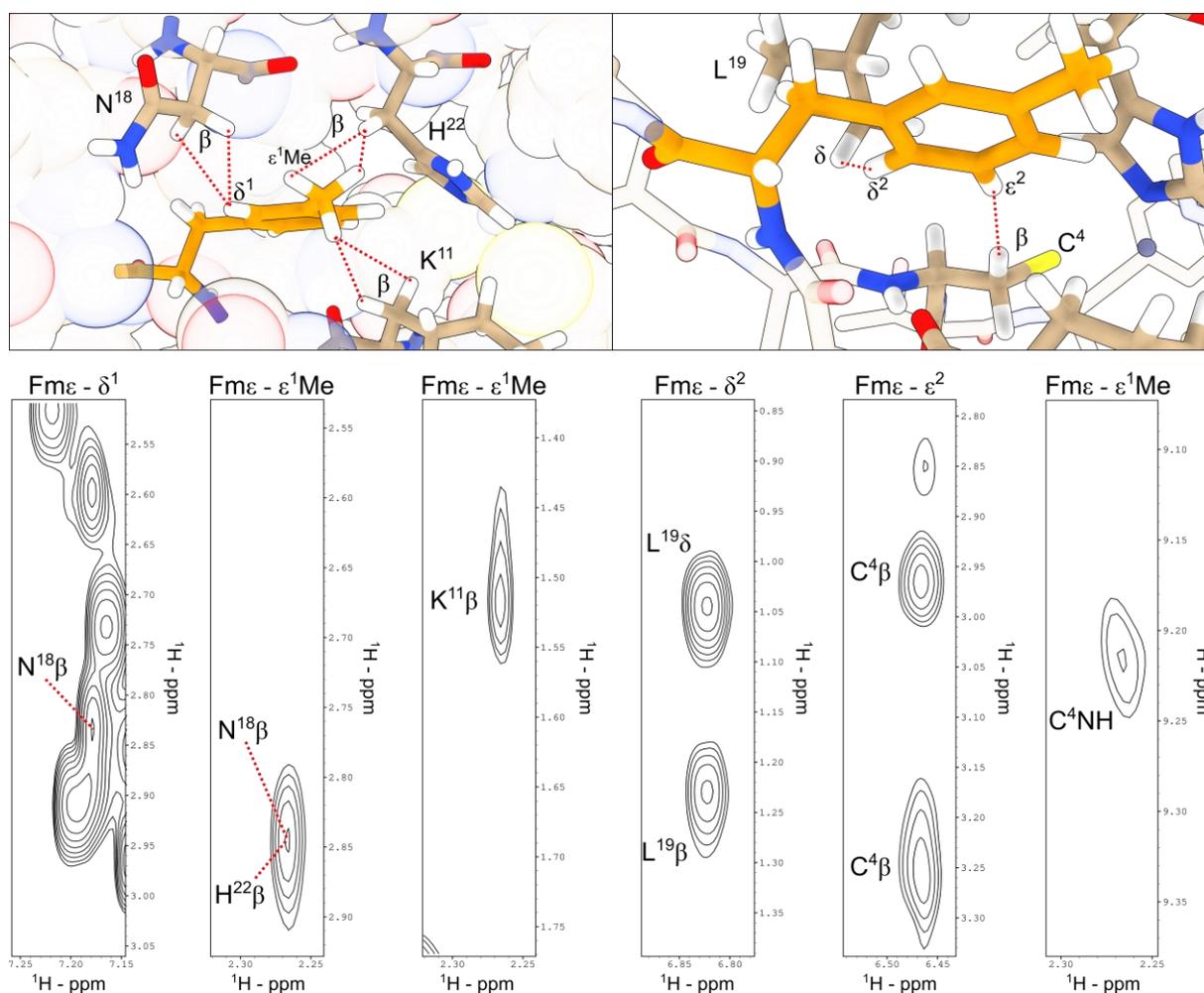


Abbildung 75: Bestimmung der Seitenketten Orientierung von $\text{Fm}\epsilon^{13}$ in ZFV-8. Die beiden Ausschnitte (oben) aus der NMR-Struktur heben die NOE-Kontakte (unten) ins Innere und Äußere des Zinkfingers hervor. Durch die exzellente Dispersion der Kreuzsignale, konnte die Ausrichtung der Methylgruppe eindeutig identifiziert werden. Nach Erhöhung der Konturlevel konnte ein Kontakt von $\text{Fm}\epsilon^{13}\epsilon^1\text{Me}$ zum Amidproton von C^4 beobachtet werden. Dieser Kontakt deutet auf ein zweites Konformer hin, bei dem die Methylgruppe ins Innere des Peptids ausgerichtet ist. NMR-Bedingungen: 600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, 290 K, 1.5 eq. Zn^{2+} , pH = 6.8.

Die Einführung einer Methylgruppe an der ε-Position führte zum nahezu vollständigen Stillstand der χ_2 -Rotation des Phenylrings innerhalb des hydrophoben Kerns. Die sterische Ausdehnung des Substituenten sollte dieses Verhältnis zusätzlich beeinflussen können. Daher folgt im nächsten Abschnitt die Untersuchung des Fie¹³-Bausteins. Festphasenpeptidsynthese, kombiniert mit der Fmoc-Schutzgruppenstrategie ermöglichte die Darstellung und Isolierung des entsprechenden Zinkfingerpeptids ZFV-9. Die Charakterisierung der Verbindung in Abwesenheit von Zink bestätigte die Vollständigkeit der Sequenz und die Reinheit des Peptids. Nach der Zugabe von 1.5 eq Zinkchlorid und Erhöhung des pH-Werts auf 6.4 wurde ein ¹H-Spektrum erhalten, das große Übereinstimmungen mit ZFV-8 aufweist. Erneut wurden, neben der starken Abschirmung der aromatischen Protonen von Fie¹³, die markante Hochfeldverschiebung von Ile²⁵γCH₃ und Ile²⁵δCH₃ zu 0.54 beziehungsweise 0.71 ppm, sowie die Tieffeldverschiebung von Cys⁴NH nach 9.17 ppm als Charakteristika für die ββ-Tertiärstruktur beobachtet. Somit wurde, im Gegensatz zu Modifikationen der ζ-Position, die signifikante Vergrößerung des ε-Substituentens der zentralen aromatischen Aminosäure im hydrophoben Kern toleriert. Die Aufnahme von ¹H-Spektren bei unterschiedlicher Temperatur enthüllte jedoch eine verringerte thermodynamische Stabilität gegenüber ZFV-8. Die Analyse der TOCSY/NOESY-Muster bestätigte das klassische Zinkfingermotiv und ermöglichte die Strukturberechnung eines NMR-Ensembles, dessen Konformer mit der niedrigsten Energie in Abbildung 76 dargestellt ist. Entsprechend den Erwartungen und im Einklang mit den analytischen Methoden wurde die gleiche Ausrichtung der Seitenkette von Fie¹³ beobachtet. Zudem konnte die Hypothese, dass eine Vergrößerung des sterischen Anspruchs die Rotation weiter einschränken würde, bestätigt werden, da selbst bei starkem Hereinzoomen keine zusätzlichen Kreuzsignale für die Orientierung zum Inneren des Zinkfingers beobachtet wurden (Abbildung 76 unten rechts). Somit ergibt sich ein Konformerverhältnis von >99/1.

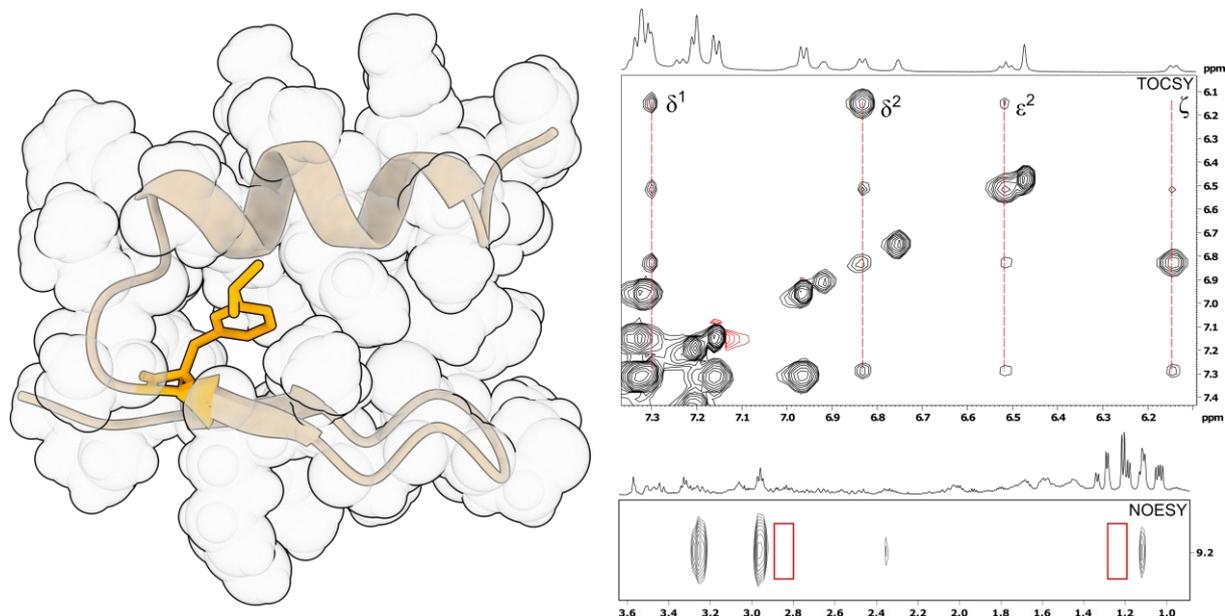


Abbildung 76: Struktureigenschaften von ZFV-9. Der Baustein Fie an der Position 13 wird im Zinkfingerstrukturmotiv toleriert und bildet einen Bestandteil des hydrophoben Kerns. Durch die Modifikation an ϵ wird die Symmetrie um χ_2 gebrochen, was zu einer guten Dispersion der aromatischen Protonen im TOCSY-Spektrum führt (rechts oben). Während in ZFV-8 Kreuzsignale beobachtet wurden, die Hinweise auf ein zweites Konformer liefern, fehlen diese Signale in der Zinkfingervariante-9 vollständig (rote Bereiche, rechts unten). NMR-Bedingungen: 600 MHz, H₂O/D₂O 9:1, 290 K 1.5 eq. Zn²⁺, pH = 6.0.

3.2.10 Systematisches Methyl-Hopping am Phe¹³ in Zinkfingerpeptiden - die δ -Position

Die Fülle an zusätzlichen Informationen über die Dynamik des hydrophoben Kerns und der generellen Faltungstabilität, die durch die Einführung eines aliphatischen Substituentens mit unterschiedlicher Größe an der ϵ -Position von Phe¹³ erhalten wurden, ließen große Erwartungen auf Analyse der δ -Position zurück. Darstellung und Isolierung der Fm δ^{13} -Zinkfingervariante (ZFV-10) folgten der etablierten Strategie der Fmoc-Festphasenpeptidsynthese mit anschließender Aufarbeitung durch semipräparativer *rp*-HPLC. Dadurch konnten aus einem 0.1 mmol Ansatz bis zu 10 mg Zinkfingerpeptid in hoher Reinheit gewonnen werden. Entgegen den Erwartungen wurde unter den Faltungsbedingungen ein ¹H-Spektrum erhalten, das zwar die entsprechenden Charakteristika aufwies, jedoch ein signifikant schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis zeigte. Zusätzlich wurde eine Degradation der spektroskopischen Qualität über einen Zeitraum von drei Tagen beobachtet. NMR-spektroskopische Analysen nach diesem Zeitraum lieferten aufgrund des schlechten Zustands der Probe keinerlei Informationen. Diese Beobachtung geht mit der geringen thermodynamischen Stabilität einher, die durch Temperaturreihen demonstriert werden konnte (Abbildung 74). Zwar konnten bei 310 K nahezu sämtliche Signale zugeordnet werden, jedoch führte ein längeres Beibehalten dieser Temperatur zur Unfähigkeit die Tertiärstruktur nach Abkühlen der NMR-Probe wiederherzustellen. Ein unerwartetes Verhalten wurde im ¹H-Spektrum bei der Erniedrigung der Temperatur auf 280 K beobachtet. Die Signale von 6.0-9.2 ppm verbreiterten signifikant unterhalb der Detektionsgrenze. Am stärksten betroffen waren hiervon die aromatischen Protonen von Fm δ^{13} , wobei auch die Methylgruppe der δ -

Position massiv an Intensität verlor. Die naheliegendste Erklärung ist, dass die Rotation von Fm δ^{13} in einem Zeitfenster nahe der Grenze des langsamen konformationellen Austauschs liegt. Das restriktive Temperaturfenster des Zinkfingerpeptids erlaubt es dennoch nicht, über weitere Temperaturreihen diese Dynamik direkt im ¹H-Spektrum sichtbar zu machen. Das Ausmaß der Verbreiterung ist für die verschiedenen Signale unterschiedlich stark ausgeprägt und betrifft hauptsächlich die Aminosäuren in Umgebung des hydrophoben Kerns. Diese Beobachtung unterstützt zusätzlich die Vermutung, dass die Rotation von Fm δ^{13} um χ^2 und die damit verbundenen Verzerrungen der benachbarten Sekundärstrukturelemente die Ursache für die Verbreiterung darstellt. Sollte dies der Fall sein, so müsste eine Ausdehnung des δ -Substituenten diese Effekte, verringerte thermodynamische Stabilität, Signalverbreiterung bei Temperaturniedrigung und selektive Signalverbreiterung für umliegende Aminosäuren, zusätzlich verstärken. Bevor das entsprechende Zinkfingerderivat hergestellt und untersucht wurde, wurden zunächst 2D-NMR-Experimente von ZFV-10 ausgewertet. Bei 300 K war eine vollständige Zuordnung der Signale erfolgreich und lieferte 152 NOE-*restraints*, die für NMR-Strukturberechnungen genutzt werden konnten. Das energieniedrigste Konformer stimmt in seinen strukturellen Merkmalen mit den anderen Zinkfingervarianten überein, wobei erneut die Methylgruppe der aromatischen Aminosäure an Position 13 außerhalb des Zinkfingerzentrums, zum Lösungsmittel orientiert ist. Die Modifikation der δ -Position scheint einen deutlichen Einfluss auf die Dynamik der Seitenkette von Fm δ^{13} auszuüben. In Analogie zu ZFV-8 wurden zusätzliche Kreuzsignale nahe der Detektionsgrenze beobachtet, die das zweite Konformere der Seitenkette kennzeichnen (Abbildung 78). Die Integration der entsprechenden Kreuzsignale ließ den Schluss zu, dass das Konformerverhältnis von 95/5 in ZFV-8 auf 70/30 in ZFV-10 verschoben wurde.

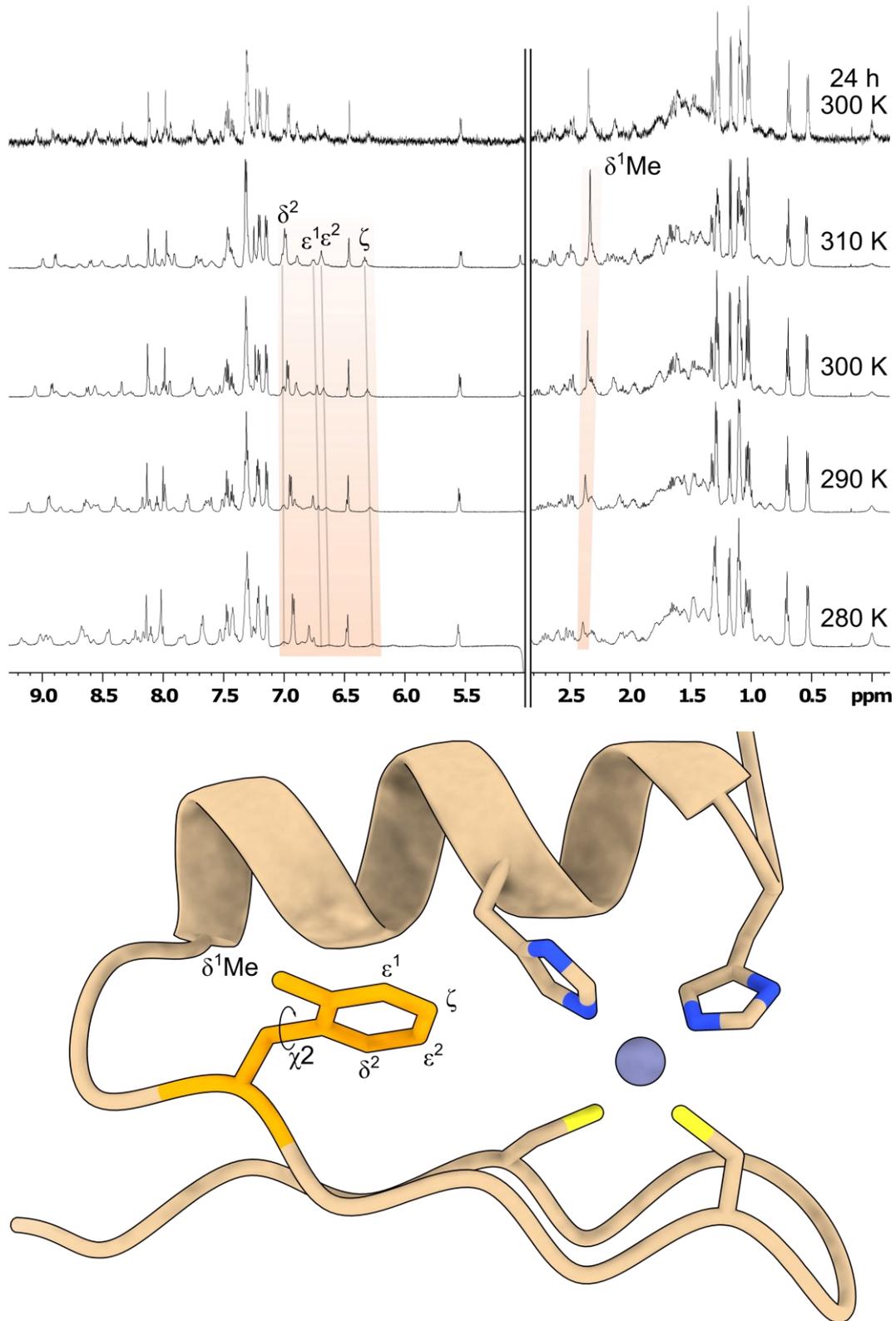


Abbildung 77: Struktureigenschaften von ZFV-10. Der Vergleich der ^1H -Spektrn bei unterschiedlicher Temperatur (oben) enthüllt eine selektive Verbreiterung für sämtliche Signale von $\text{Fm}\delta^{13}$ (orange) bis zur Detektionsgrenze. Die Auswertung des NOESY-Spektrums in Kombination mit NMR-Strukturberechnungen erlaubte die Darstellung eines dreidimensionalen Strukturabbaus des Zinkfingerpeptids. Wie bei ZFV-8 und 9 ist die Methylgruppe nach außen orientiert. NMR-Bedingungen: 600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, 300 K, 1.5 eq. Zn^{2+} , pH = 6.0.

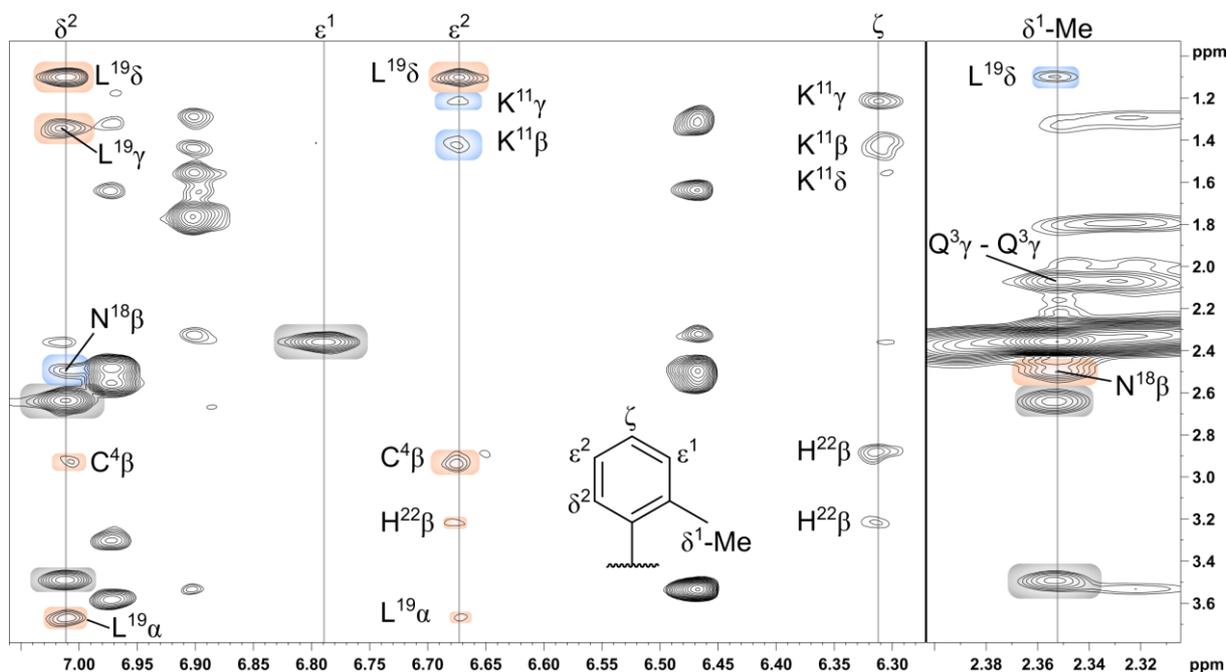


Abbildung 78: Identifizierung der Seitenkettenorientierung von Fm δ^{13} (ZfV-10) im NOESY-Spektrum. Die in orange hervorgehobenen Kontakte signalisieren das Hauptkonformer mit der Ausrichtung der δ^1 -Methylgruppe nach außen zum Lösungsmittel. In einem Verhältnis von ca. 70/30 liegt ein weiteres Konformer (blau) vor, dessen Kreuzsignale auf eine Orientierung zum Inneren des Zinkfingers hindeuten. Kreuzsignale zu Protonen der gleichen Aminosäure wurden grau hinterlegt. NMR-Bedingungen: 600 MHz, H₂O/D₂O 9:1, 300 K, 1.5 eq. Zn²⁺, pH = 6.0.

Um der Strategie von Kapitel 3.2.9 zu folgen, wurde anschließend das Zinkfingerderivat ZfV-11 mit der F13Fi δ Mutation synthetisiert. Wie zu erwarten, erfolgte der Einbau dieser unnatürlichen Aminosäure problemlos und resultierte in ausreichenden Mengen an reinem Zinkfingerpeptid für analytische Untersuchungen. Die *apo*-Variante lieferte ein Signalmuster im ¹H-Spektrum, das in Analogie zur ZfV-10 steht (Abbildung 79). Die Charakterisierung des Zinkfingerderivats erfolgte sowohl durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie als auch mit hochauflösender Massenspektrometrie. Beide analytische Verfahren bestätigten die Vollständigkeit und Reinheit der Sequenz. Die Zugabe von Zinkchlorid, gefolgt von der Erhöhung des pH-Werts führte zu einem Spektrum mit typischen Zinkfingersignalen. Bei dem Versuch, eine vollständige Zuordnung der Signale durchzuführen wurde festgestellt, dass zwar NH, H α und H β von Fi δ^{13} vorhanden, jedoch bei keiner Temperatur Signale aromatische Protonen dieser Position zu detektieren waren. Diese Beobachtung setzte sich für die Aminosäure 14-18 fort, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu Fi δ^{13} angeordnet sind und keinerlei Signale zeigten (Abbildung 79). Erst Leu¹⁹ konnte vollständig zugeordnet werden, wobei ein Tieffeldverschiebung der δ -Protonen von 1.09 (ZfV-10) zu 1.40 ppm verzeichnet wurde. Weiterhin konnte weder das Amid, noch das H α -Proton von His²² beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Vergrößerung des δ -Substituenten während der Rotation der Seitenkette um χ_2 eine größere Verzerrung der umliegenden Sekundärstrukturelemente bedingt. Die dadurch erhaltenen langsamen Bewegungen würden ausreichen, um einen solch starken Mittelungseffekt zu erzielen, dass die Signale unterhalb der Detektionsgrenze verbreitern. Ein weiteres Indiz für die starken strukturellen Veränderungen ist die niedrige thermodynamische Stabilität der Zinkfingervariante. Selbst

eine Lagerung der Lösung bei niedriger Temperatur führte nach wenigen Tagen zur Degradation der Probe. Erhöhung der Temperatur führte ebenfalls zum schnellen Entfalten der Tertiärstruktur, gefolgt von anschließender Aggregation. Hierbei kann die Frage gestellt werden, warum der Verlust der Tertiärstruktur die Aggregation initiiert. Das $\beta\beta\alpha$ -Motiv, welches durch die Zugabe von Zn^{2+} gebildet und stabilisiert wird, wirkt wie eine natürliche Schutzgruppe für die reaktiven Seitenketten der Cysteine, die bei dem typischen Zinkfinger-pH-Wert als Thiolate vorliegen. Diese protektive Eigenschaft ermöglichte die selektive Modifikation einer weiteren Cysteineinheit, ohne die Notwendigkeit einer zusätzlichen Schutzgruppe, wie RODRIGUEZ *et al.* demonstrieren konnten.^[457] Ist das Peptid nun nicht in der Lage die entsprechende Struktur auszubilden, wird die Koordination von Zn^{2+} an Schwefel geschwächt, wodurch die Entstehung von Disulfiden gefördert wird. Da diese Zyklisierung nicht regioselektiv verläuft, können Oligomere entstehen, die ultimativ zur Aggregation des Zinkfingers führen.

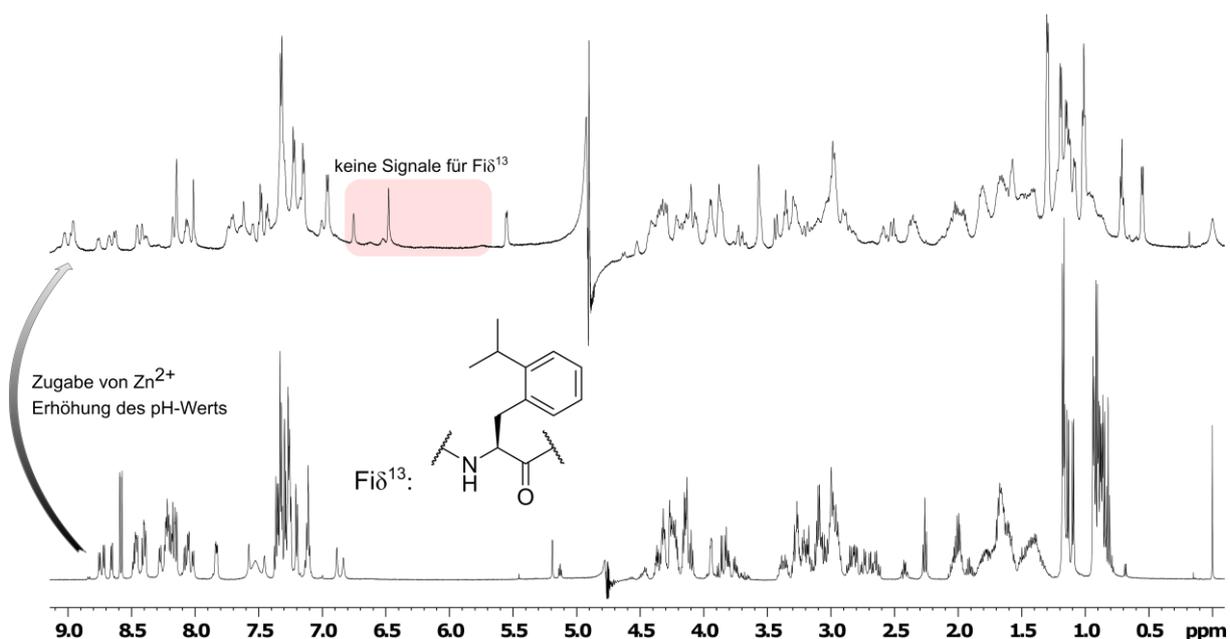


Abbildung 79: Charakterisierung der Faltungseigenschaften von ZFV-11. Nach erfolgreicher Darstellung und Aufarbeitung der Zinkfingervariante-11 konnte durch das ^1H -Spektrum (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH = 3.0, 300 K) in Kombination mit Massenspektrometrie die Vollständigkeit der Sequenz nachgewiesen werden. Die Zugabe von Zn^{2+} führte zwar zu einem Signalmuster (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH = 6.3, 1.5 eq. Zn^{2+} , 290 K), das Elemente einer klassischen $\beta\beta\alpha$ -Struktur enthält, jedoch konnten durch Signalverbreiterung viele Signale nicht detektiert werden.

Zusammenfassend kann also folgende Aussage über *mono*-Substitutionen der δ , ϵ und ζ -Positionen von Phe^{13} und deren Auswirkungen auf die Dynamik und Stabilität von Cys_2Hys_2 -Zinkfingern getroffen werden: Sowohl die Position der Modifikation am aromatischen Ringsystem im hydrophoben Kern als auch das sterische Ausmaß des Substituenten übt einen markanten Einfluss auf die thermodynamischen Eigenschaften von Zinkfingerpeptiden aus. Während ζ -Modifikationen bis zu einer gewissen Größe toleriert werden, erfolgte in jedem untersuchten Derivat eine Reduktion der thermodynamischen Stabilität, da die *edge-to-face*-Wechselwirkung mit dem benachbarten Imidazol von His^{22} unterbunden oder abgeschwächt wird. Weiterhin führt die Dislokation der aromatischen Seitenkette zur

Destabilisierung des hydrophoben Kerns. Da die Substitution von ζ die Symmetrie um χ^2 beibehält, wurde weiterhin ein AA'BB'-Spin-System durch eine schnelle Rotation des Rings beobachtet. Dieses Muster konnte durch eine aliphatische Modifikation an der ε -Position aufgebrochen werden, da die Asymmetrie ein ABCDE-Spin-System bedingt. Hervorzuheben ist hierbei ZFV-8 (Fm ε^{13}), das nicht nur eine exzellente thermodynamische Stabilität demonstrierte, sondern durch die enorme Dispersion seiner Seitenkette eine detaillierte Beschreibung der Seitenkettenorientierung zuließ. Durch die geometrische Zusammensetzung des hydrophoben Kerns reichte die Methylierung der ε -Position aus, um die Rotation um χ^2 nahezu vollständig zu unterbinden. In der Nähe des Signalrauschens konnten dennoch Kreuzsignale ausgemacht werden, die das andere Konformer kennzeichneten. Ausdehnung des Substituenten (Fi ε) führte zur vollständigen Unterbindung der Umdrehung, da keine Signale des zweiten Konformers beobachtet wurden. Die Modifikation der ε -Position resultierte in Zinkfingervarianten mit guter bis exzellenter thermodynamischer Stabilität. Im Kontrast dazu, wurde eine signifikante Destabilisierung durch die F13Fm δ -Mutation beobachtet. Zweidimensionale NMR-Spektroskopie enthüllte eine Verschiebung des Konformerenverhältnis auf 70/30. Obwohl die unnatürliche Aminosäure auf Bausteinebene eine höhere Energiebarriere für die Rotation um χ^2 besitzt, die durch sterisch ungünstige Wechselwirkungen mit den eigenen β -Protonen hervorgerufen wird, scheinen die Rahmenbedingungen des hydrophoben Kerns eine Rotation zu erlauben. Die Rotation von Fm δ^{13} ist schnell genug, um scharfe Signale bei 300 K zu generieren. Die Erniedrigung auf 280K führte jedoch zur Verbreiterung der aromatischen Signale bis zur Detektionsgrenze. Die Zunahme der Signalbreite tritt in diesem Ausmaß nur für die Seitenkette von Fm δ^{13} auf. Der Einbau von Fi δ an Position 13 im hydrophoben Kern führte zur Verlangsamung der Rotationsbewegung, wodurch bei 300 K nicht nur keine aromatischen Signale der synthetischen Aminosäure erkennbar waren, sondern auch Signale der benachbarten Gruppen (Positionen 14-18) verschwanden. Eine mögliche Erklärung liegt in der starken strukturellen Verzerrung, die durch die langsame Rotation des sterisch anspruchsvollen Ringsystem von Fi δ entsteht.

3.2.11 Der Einfluss von doppelten Modifikationen des aromatischen Ringsystems

Nachdem in den vorherigen zwei Kapiteln der Einfluss von einzelnen asymmetrischen Modifikationen von Phe¹³ auf die Dynamik und Stabilität von Zinkfingerpeptiden evaluiert wurde, soll im folgenden Kapitel die Auswirkungen von doppelten asymmetrischen Substitutionen charakterisiert werden. Nimmt man den Phenylring als Grundgerüst und geht von Methylgruppen als Substituenten aus, so ergeben die fünf Positionen durch ihre Symmetrie nur vier mögliche Derivate: Die *syn*-artige Methylierung an δ/ε beziehungsweise ε/ζ , ein Derivat mit einem unsubstituierten Kohlenstoffatom Abstand, δ/ζ sowie zwei Kohlenstoffatome zwischen den Substitutionen – δ/ε' . Die etablierte Syntheseroute mit einer Kreuzkupplung nach NEGISHI^[452] ermöglichte die Darstellung der besprochenen Bausteine, wobei nur drei Derivate synthetisiert wurden. Erneut stellt sich die Frage nach der Nomenklatur dieser

unnatürlichen Aminosäuren. Da die doppelte Modifikation bei expliziter Benennung der Positionen den Rahmen des Dreibuchstabencodes aufsprengen würde, musste eine andere Vorgehensweise entwickelt werden. Eine Fokussierung auf die Funktionalität der Seitenketten enthüllt, dass es sich um Xylyl-Derivate handelt. Dabei ermöglicht der Zusatz von *ortho*, *meta* oder *para*, die Anordnung der Methylgruppen zueinander zu beschreiben. Da zwei Derivate eine *syn*-artige Anordnung von Methylgruppen besitzen, muss die Unterscheidung, solange nur drei Buchstaben verwendet werden sollen, durch die Groß- beziehungsweise Kleinschreibung erfolgen. Demnach ergeben sich folgende Möglichkeiten (Abbildung 80).

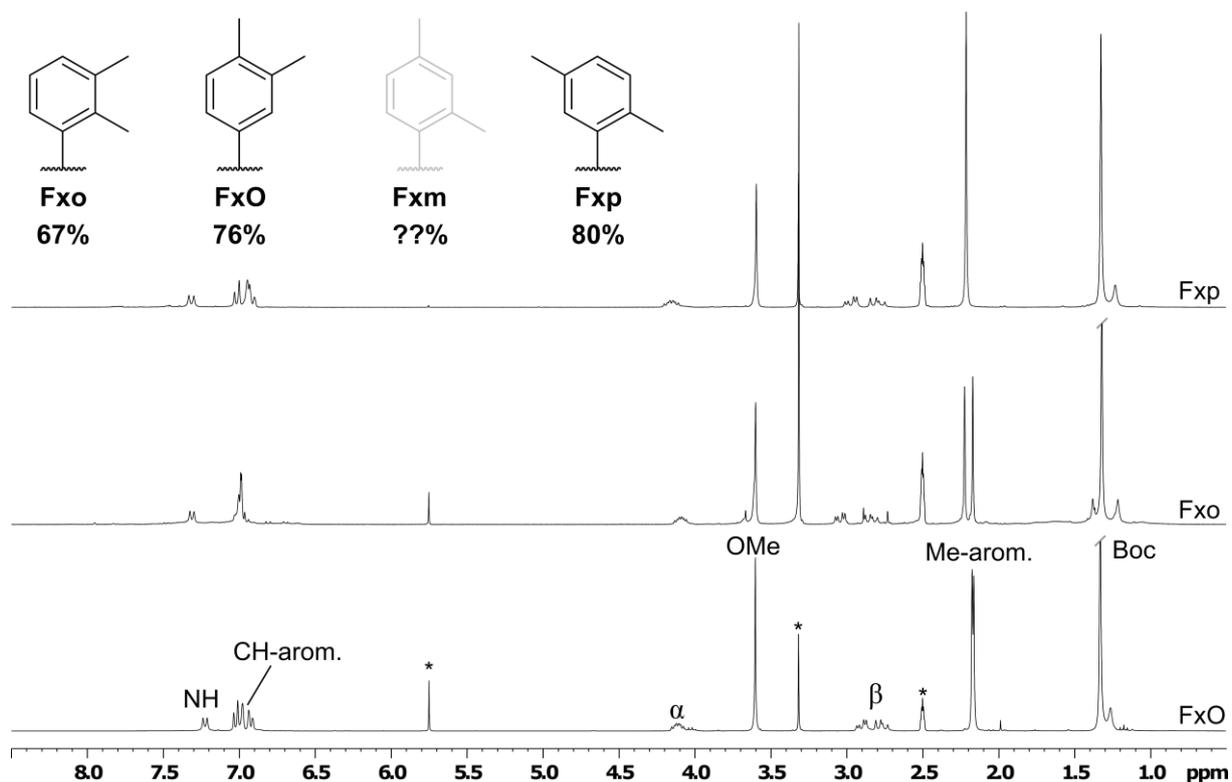


Abbildung 80: Übersicht der synthetisierten und möglichen doppel-modifizierten Phenylalaninderivate. Die Nomenklatur der *building blocks* setzt sich aus dem Korpus (Phenylalanin), der Art der Modifikation (Xylyl) und der Anordnung der Methylgruppen (o, O – *ortho*; m – *meta*; p – *para*) zusammen. Sämtliche Derivate konnten in guter Ausbeute und Reinheit erhalten werden. NMR-Bedingungen: 300 MHz, DMSO_{d6}, 300 K.

Um ein gutes Verhältnis zwischen Informationsgewinn und benötigten Ressourcen zu garantieren, wurde der Baustein Fxm sowie der Zinkfinger mit FxO nicht synthetisiert, da die vorherigen Kapitel zeigen konnten, dass eine ζ-Modifikation keinen Einfluss auf die Rotationsdynamik von Phe¹³ ausübt. Daher wurden nur zwei Zinkfingervarianten (ZFV-11: Fxo¹³ und ZFV-12: Fxp¹³) mit doppelten Methylierungen der Phe¹³-Seitenkette dargestellt und charakterisiert.

Zweidimensionale NMR-Spektroskopie der *apo*-Variante von ZFV-12 bestätigte den Einbau der unnatürlichen Aminosäure, sowie die Vollständigkeit der Sequenz. Wie zu erwarten, wurde nach Zugabe von Zink²⁺ und Erhöhung des pH-Werts ein Signalmuster erhalten, das der Zinkfingervariante-8 sehr ähnlich ist. Temperaturreihen zeigten jedoch eine leicht verringerte thermodynamische Stabilität, wobei bei 310 K noch ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis beobachtet wurde. Da der sterische

Anspruch der Seitenkette von Fxo¹³ vergrößert ist und eine Modifikation von δ und ϵ vorliegt, konnten keine Kreuzsignale einer zweiten Orientierung erhalten werden (Abbildung 81). Das berechnete NMR-Strukturensemble zeigt daher eine Konformation, die neben dem klassischen $\beta\beta\alpha$ -Strukturmotiv die Ausrichtung der Methylgruppen außerhalb des Zinkfingerzentrums aufweist. Zwar sind die Übereinstimmungen der Struktur in Analogie zu ZFV-8 verblüffend, dennoch gibt es zwei Herausstellungsmerkmale. Zum einen erreicht die Abschirmung des ζ -Protons in diesem Zinkfingerpeptid sein bisheriges Maximum. Mit einer chemischen Verschiebung von 5.84 ppm liegt es signifikant weiter im Hochfeld, als es für aromatische Protonen üblich ist.^[458] Diese Beobachtung findet ihre Begründung neben einer intensiven *edge-to-face*-Wechselwirkung mit dem Imidazol des His²², in der zusätzlichen Abschirmung durch die benachbarten Methylgruppen des Phenylrings. Im Kontrast zu dieser starken Hochfeldverschiebung enthüllten detaillierte Auswertungen des NOESY-Spektrums von ZFV-12, dass eine andere Orientierung von Fxo¹³ vorliegt. Während im NOESY-Spektrum von ZFV-8 das Fme¹³- ζ -Proton deutliche Kontakte zu den β -Protonen von His²² zeigt, fehlen diese in ZFV-12 (Abbildung 81). Diese Beobachtung spiegelt sich auch in der NMR-Struktur wider. Fxo¹³ zeigt in Kombination mit einer anderen Orientierung von His²² eine leichte Dislokation vom hydrophoben Kern. Dadurch vergrößert sich der Abstand, sodass keine Kreuzsignale sichtbar sind.

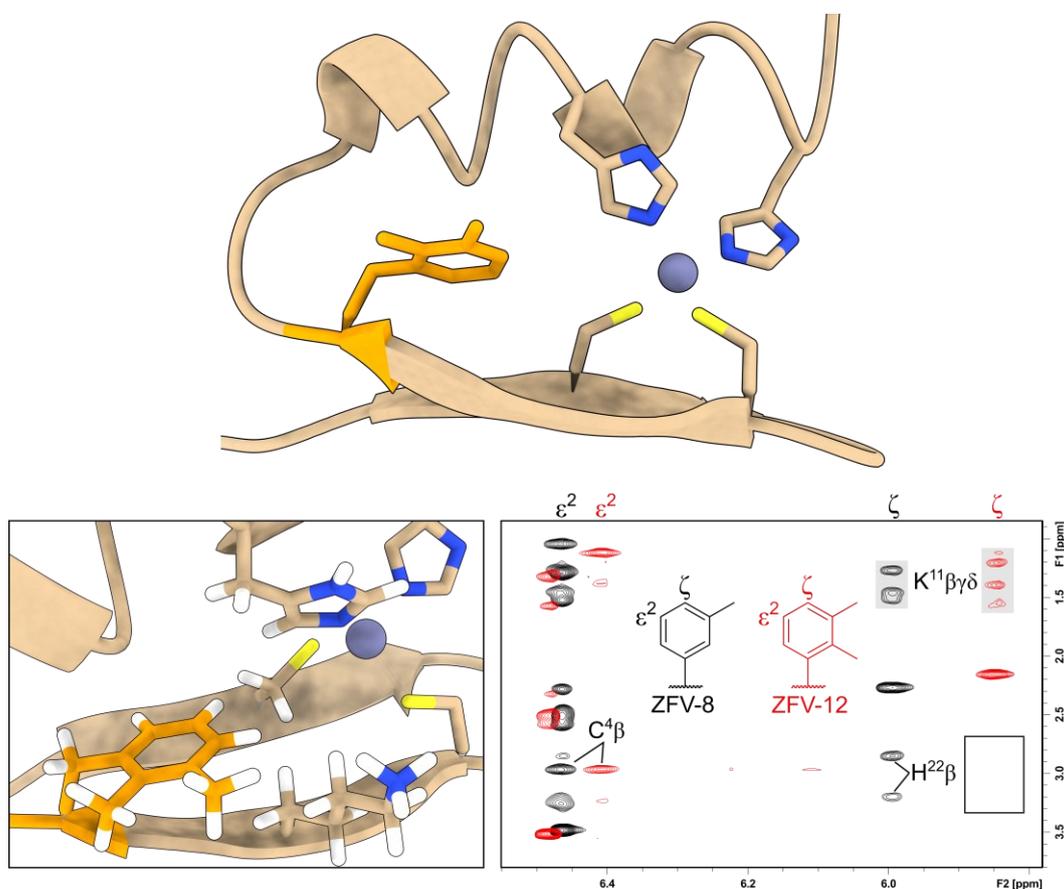


Abbildung 81: Strukturelle Merkmale der Zinkfingervariante-12. NMR-Strukturberechnungen enthüllten das für Zinkfingerpeptide klassische $\beta\beta\alpha$ -Strukturmotiv (oben). Die detaillierte Betrachtung des hydrophoben Kerns (unten links) hebt den Unterschied zum Fme¹³-Derivat hervor. Die *syn*-artige Methylierung führt zu einer unterschiedlichen Ausrichtung des Phenylrings, wodurch keine NOE-Kontakte (rechts) zum H²² β sichtbar sind. NMR-Bedingungen: 600 MHz, 290 K, H₂O/D₂O 9:1, 1.5 eq. Zn²⁺, pH = 6.9.

Der Einbau des *Fxp-building-blocks* verspricht interessante Ergebnisse, da durch die gegenüberliegenden Substitutionen (δ und ϵ') zwei mögliche Szenarien eintreten können. In jeder Konformation befindet sich eine Methylgruppe innerhalb des Zinkfingerzentrums. Dadurch können neue Erkenntnisse über die geometrischen Restriktionen des hydrophoben Kerns erhalten werden. Weiterhin ist es denkbar, dass eine Rotation trotzdem stattfindet, da die Grundzustände der Rotation um χ_2 angehoben werden könnten. Abermals erfolgte die Darstellung der entsprechenden Zinkfingervariante-12 durch Festphasenpeptidsynthese mit Fmoc als temporäre Schutzgruppe. Reinheit und Vollständigkeit der Sequenz wurden durch *rp*-HPLC und zweidimensionale NMR-Spektroskopie bestätigt. Unter den etablierten Faltungsbedingungen konnte ein ^1H -Spektrum erhalten werden, das selbst bei 300 K signifikante Verbreiterung der aromatischen Protonen von *Fxp*¹³ aufzeigt. Dies deutet auf eine intrinsische Dynamik des Peptids hin, angetrieben durch die Rotation um χ_2 . Eine weitere Besonderheit liegt in der chemischen Verschiebung von C^4NH . Während in natürlichen oder mit ϵ -beziehungsweise ζ -modifizierten Zinkfingern dieses amidische Proton die größte chemische Verschiebung mit über 9.2 ppm besitzt, ist es in diesem Peptid weiter Richtung Hochfeld auf 8.95 ppm verschoben. Dieses Phänomen kann durch eine Umordnung des hydrophoben Kerns erklärt werden, da eine Methylgruppe permanent ins Innere des Zinkfingers ausgerichtet sein muss. Dieser Effekt wirkt sich auch auf die chemischen Verschiebungen der aromatischen Protonen von *Fxp*¹³ aus. Während in sämtlichen Derivaten, die über ein ζ -Proton verfügen, diese bei ca. 6 ppm das am stärksten abgeschirmte Signal darstellen, konnte dem aromatischen Signal im Tieffeld bei 6.15 ppm dem ϵ -Proton zugeordnet werden (Abbildung 82). Erst dann folgt ζ mit 6.45 ppm. Selbstverständlich kann eine Begründung in den veränderten elektronischen Eigenschaften des Ringsystems durch das Methylierungsmuster gefunden werden, dass jedoch als alleinstehendes Merkmal unzureichend für eine vollständige Erklärung dieser Beobachtung wäre. Vielmehr scheint die starke Abschirmung des ϵ -Protons, welches im ZFV-10 eine Verschiebung von 6.79 ppm besitzt, durch eine andere Orientierung der Seitenkette hervorgerufen zu werden. Denkbar wäre hierbei, dass durch die Dislokation der Seitenkette nicht mehr ζ , sondern ϵ eine *edge-to-face*-Wechselwirkung mit dem benachbarten Imidazol von His²² eingeht. Um dies zu überprüfen, sollte ein NMR-Strukturensemble erstellt werden (Abbildung 82). Leider verminderten die dynamischen Prozesse innerhalb des hydrophoben Kerns die Anzahl und Qualität der NOE-Kontakte, wodurch eine größere Variation der Strukturen erhalten wurde.

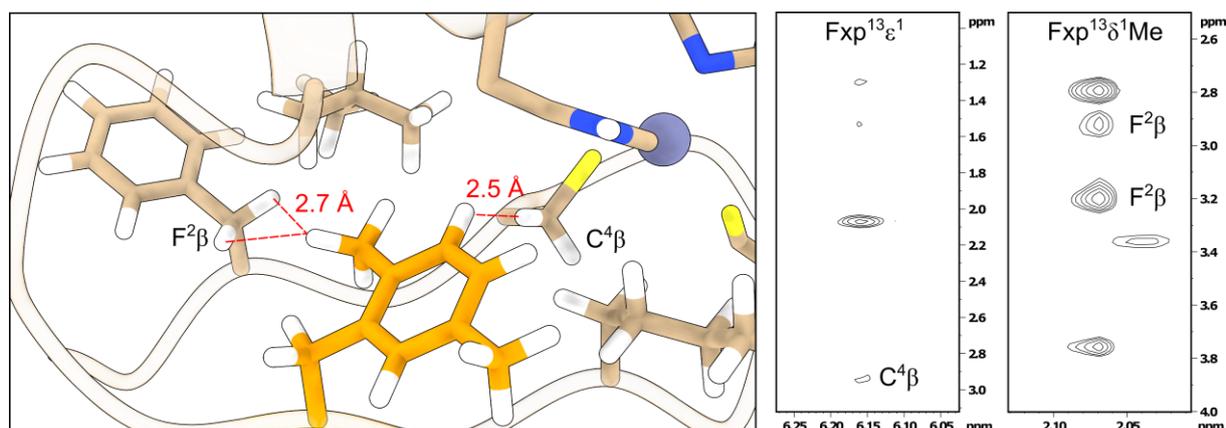


Abbildung 82: Zusammensetzung des hydrophoben Kerns von ZFV-13. Der Ausschnitt der NMR-Struktur von ZFV-13 mit Fokus auf Fxp¹³ stellt die wichtigen Kontakte innerhalb des hydrophoben Kerns dar (links). Zwar ist der kurze Abstand zwischen Fxp¹³δ¹Me zu F²β gut auf das NOESY-Spektrum (rechts, 600 MHz, 290 K, H₂O/D₂O 9:1, 1.5 eq. Zn²⁺, pH = 6.8) übertragbar, jedoch wurde ein viel zu schwaches Kreuzsignal für das Atompaar Fxm¹³ε¹ – C⁴β beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz liegt in der Dynamik des hydrophoben Kerns.

Abbildung 82 zeigt, dass für ZFV-13 ein klassisches ββα-Strukturmotiv erhalten wurde. Die genauere Betrachtung des hydrophoben Kerns enthüllt die Ausrichtung der Seitenkette von Fxp¹³. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von ZFV-8 und ZFV-10 zeigt die δ-Methylgruppe ins Innere des Zinkfingers, während der ε-Methylrest nach außen ausgerichtet ist. Die Zusammensetzung des hydrophoben Kerns wirft jedoch weitere Fragen auf. In der Konformation mit der niedrigsten Energie ist ein kurzer Abstand von Fxp¹³δ¹-Me - F²β und Fxp¹³ε¹ - C⁴β mit 2.7 respektive 2.5 Å zu erkennen. Während der Kontakt zum Phenylalanin in guter Näherung der Intensität der NOE-Kreuzsignale entspricht, ist nur ein sehr schwaches Signal zum C⁴β sichtbar. Alle weiteren NOE-restraints bezüglich der Ausrichtung wurden jedoch erfüllt – so wurden im NOESY-Spektrum zwei starke Kontakte zu Q³α und C⁴NH beobachtet, die adäquat im NMR-Strukturensemble wiedergegeben wurden. Die Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen liegt in der Limitation beider Methoden. Da die Länge des FID in der NMR-Spektroskopie an die Relaxationszeit der entsprechenden Kerne gekoppelt ist und üblicherweise mehreren Sekunden beträgt, ist das entstehende Spektrum als eine Mittelung der Signale aufzufassen.^[459] Durch dynamische Prozesse des biologischen Makromoleküls, kann diese Mittelung ein NOE-Muster erzeugen, das einer physikalisch unrealistischen Struktur entspricht.^[459] Die Verbreiterung bestimmter Signale im NMR von ZFV-13 deutet auf langsame Bewegungen mit einer großen Amplitude hin, wodurch die Genauigkeit des NOESY-Spektrums verringert wird. Zwar sind moderne Algorithmen in Programmen zur NMR-Strukturberechnung in der Lage, diese Effekte teilweise zu kompensieren, dennoch können die Auswirkungen vereinzelt nicht vollständig ausgeglichen werden.^[460,461]

Um eine präzisere Darstellung der dreidimensionalen Anordnung dieser Zinkfingervariante zu ermöglichen, könnten Moleküldynamik-Simulationen durchgeführt werden (Abbildung 83). Anschließend wird eine begrenzte Auswahl von MD-Schnappschüssen selektiert, die die NOE-restraints am besten wiedergeben. Alternativ könnte eine gemittelte Struktur aus diesen Strukturbildern generiert werden, wobei hierdurch artifizielle Kontakte als Artefakte eingeführt werden könnten.

Zusammenfassend kann der postulierte Strukturvorschlag bezüglich der Seitenkettenausrichtung von Fxp¹³ dennoch als qualitativ ausreichend gewertet werden, da ein Großteil der Distanzen in der NMR-Struktur mit den NOE-Kontakten übereinstimmt. So zeigt die ϵ^2 -Methylgruppe bis auf einige Kontakte zur Lys¹¹-Seitenkette keine NOE-Kreuzsignale, was auf die Orientierung außerhalb des hydrophoben Kerns hindeutet. Eine Beschränkung auf NMR-Spektroskopie würde die Charakterisierung der Beweglichkeit von Fxp¹³ verhindern, da die selektive Verbreiterung von Signalen im ¹H-Spektrum bei unterschiedlicher Temperatur zwar eine Dynamik der aromatischen Seitenkette im hydrophoben Kern indiziert, jedoch keine Kreuzsignale für die andere Konformation beobachtet wurden.

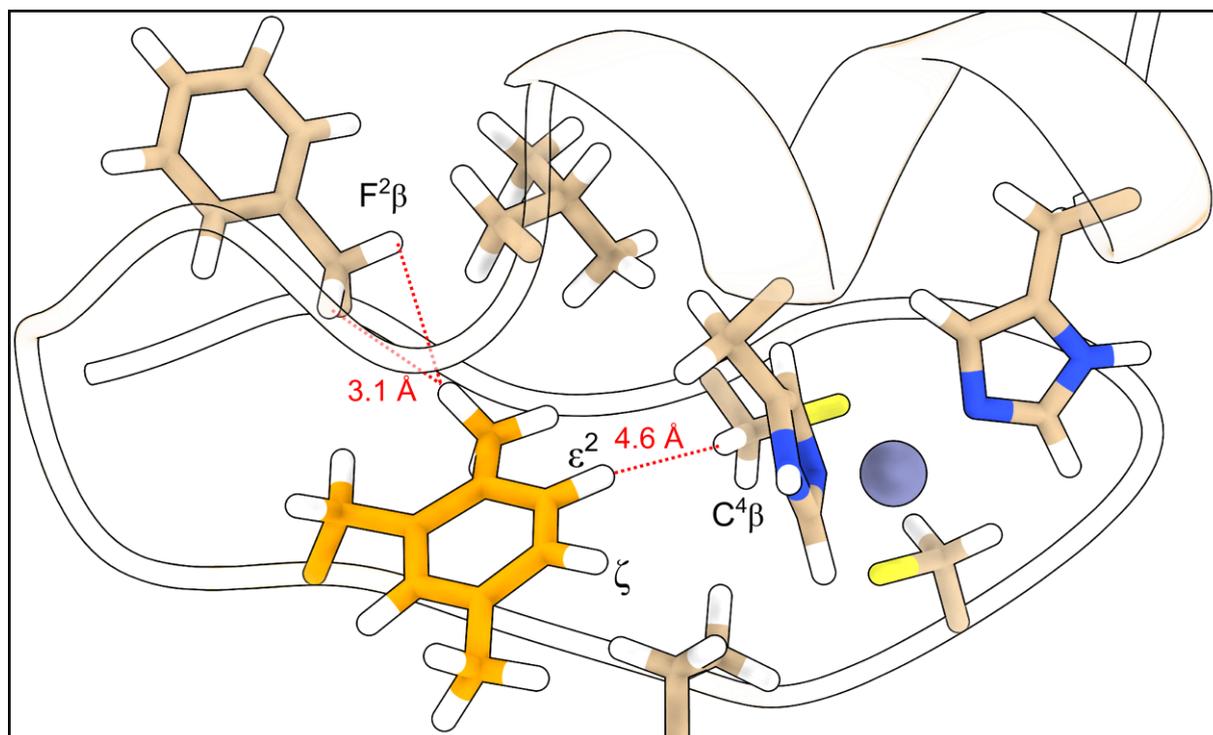


Abbildung 83: Beispielkonformation, die während der MD-Simulation von ZFV-13 eingenommen wurde. Die eingezeichneten Distanzen spiegeln die Intensität des NOE-Musters im Vergleich zur NMR-Struktur präzise wider.

Zusammenfassend kann Folgendes festgehalten werden: Die doppelte asymmetrische Modifikation des Phenylrings der Position 13 im hydrophoben Kern eines Zinkfingerpeptids kann einen signifikanten Einfluss sowohl auf die thermodynamische Stabilität als auch auf die Dynamik des Systems ausüben. Die *syn*-artige Doppelmethylierung führte zu einem Strukturmotiv, das sehr ähnlich zu ZFV-8 und ZFV-9 ist. Neben der stabilen Faltung konnte durch den einseitigen sterischen Anspruch in der Fxo¹³-Seitenkette die Rotation um χ_2 nahezu vollständig eingeschränkt werden. Dementsprechend sind beide Methylgruppen außerhalb des Zinkfingerzentrums orientiert. Durch die intensive Abschirmung der benachbarten ϵ -Methylgruppe sowie der *edge-to-face*-Wechselwirkung mit dem Imidazol von His²², erfährt das ζ -Proton die bisher stärkste Hochfeldverschiebung von allen Zinkfingerderivaten auf 5.84 ppm. Interessanterweise wird dieser Effekt durch die Einführung des Fxp-Bausteins auf das ϵ^1 -Proton verschoben, das in dieser Zinkfingervariante das am meisten abgeschirmte aromatische Signal

darstellt. Der Grund liegt hierfür in dem unterschiedlichen Methylierungsmuster der Seitenkette. Durch die gegenüberliegende Anordnung der Substituenten befindet sich die δ -Methylgruppe permanent im Inneren des Zinkfingers, was zu einer Dislokation des Phenylrings führt. Infolgedessen erfährt nun ϵ^1 einen starken Ringstromeffekt und wird zu 6.16 ppm verschoben. Die Verzerrung des hydrophoben Kerns resultiert in struktureller Instabilität, weshalb die gemittelten NOE-Signale nur eine qualitativ minderwertige Struktur hervorbrachten. Die selektive Verbreiterung mancher Signale im ^1H -Spektrum deuteten auf dynamische Prozesse der Fxp¹³-Seitenkette hin, die jedoch keine weiteren Kreuzsignale für die zweite Orientierung zeigte. Fortführende Untersuchungen sollen daher theoretische Methoden verwenden, um eine detaillierte Charakterisierung der Flexibilität von modifizierten Phenylalaninen im hydrophoben Kern zu ermöglichen.

3.2.12 Moleküldynamik-Simulationen von Zinkfingerpeptiden mit modifiziertem hydrophoben Kern

Die vorherigen drei Kapitel widmeten sich der Charakterisierung von modifizierten Phenylalaninen bezüglich der korrelierten Dynamik innerhalb des hydrophoben Kerns von synthetischen Zinkfingerpeptiden. NMR-Spektroskopie legte den experimentellen Grundstein für weiterführende theoretische Untersuchungen mittels Moleküldynamik-Simulationen. Innerhalb der 1.5 μs -langen MD-Simulation von ZFV-1 konnte keine Umdrehung um χ_2 für Phe¹³ beobachtet werden. Da durch NMR-Studien ein Anstieg der Rotationsbarriere für substituierte Phenylalanine demonstriert werden konnte, wurden die klassische Moleküldynamik-Simulation nur für die Equilibrierung der NMR-Struktur verwendet. Nach 100 ns Simulationsdauer wurde anschließend in Analogie zu Kapitel 3.2.5 die wohltemperierte Metadynamik durchgeführt. Die kollektive Variable wurde erneut durch den χ_2 -Diederwinkel von X¹³ ($\text{C}\alpha\text{-C}\beta\text{-C}\gamma\text{-C}\delta_1$) definiert. Die temperaturabhängige Verbreiterung von Signalgruppen im ^1H -NMR für selektierte Derivate deutete auf dynamische Prozesse innerhalb des Zinkfingerpeptids hin. Als mögliche Quelle wurde hierbei die Rotation des X¹³-Phenylrings um χ_2 identifiziert, da diese Protonen am stärksten von der Verbreiterung betroffen waren. Eine freie Umdrehung ist aufgrund der sterischen Restriktionen nicht möglich, weshalb einzelne Seitenkette oder ganze Strukturelemente ausweichen müssen, um den benötigten Raum zu liefern. Da die *wt*-Metadynamik die Simulation so manipuliert, dass eine Rotation um χ_2 forciert wird, könnten die daraus folgenden strukturellen Verzerrungen die Stabilität des Peptids während Simulation verringern. Dieser Einfluss sollte vermehrt für sterisch anspruchsvolle Reste beobachtbar sein. ZFV-8 war in der Lage seine Tertiärstruktur innerhalb der *wt*-Metadynamik aufrechtzuerhalten, während ZFV-10, in Übereinstimmung mit der verminderten thermodynamischen Stabilität und Degradation der NMR-Probe nach mehreren Tagen, innerhalb weniger hundert Nanosekunden entfaltet. Daher wurden für diese Derivate zusätzliche Einschränkungen bezüglich ihrer Sekundärstrukturelemente appliziert. Im Detail wurden die Diederwinkel φ ($\text{C}_{i-1}, \text{N}_i, \text{C}\alpha_i, \text{C}_i$) und ψ ($\text{N}_i, \text{C}\alpha_i, \text{C}_i, \text{N}_{i+1}$), die die Anordnung des

Peptidrückgrats beschreiben mit einer Kulanz von 10° auf die Parameter der jeweiligen NMR-Struktur begrenzt. Um lokale Abweichungen dennoch zu ermöglichen, wurde die Kraftkonstante dieser *restraints* auf 50 kJ/mol beschränkt. Der kritische Wissenschaftler mag hierbei die Frage stellen, ob diese Einschränkungen einen Einfluss auf die Energiebarriere der χ_2 -Rotation ausüben. Um die Ergebnisse dieses Kapitels ein wenig vorzugreifen, konnte kein Einfluss der Restriktionen festgestellt werden, da Derivate, die eine sterisch anspruchsvolle Seitenkette enthalten teilweise niedrigere Energiebarrieren lieferten. Weiterhin wurde eine kurze *wt*-Metadynamik von ZFV-8 in Gegenwart von *restraints* durchgeführt, wobei die Ergebnisse nahezu deckungsgleich mit den Simulationen ohne Einschränkungen sind. Für ZFV-11 ($\text{Fi}\delta^{13}$) wurde keine *wt*-Metadynamik durchgeführt, da die spektroskopische Qualität unzureichend für die Erstellung von NMR-Strukturen war. Ohne verlässliche Startstrukturen, würden die Ergebnisse der Simulationen keine Aussagekraft besitzen, da ihre Richtigkeit stark angezweifelt werden kann.

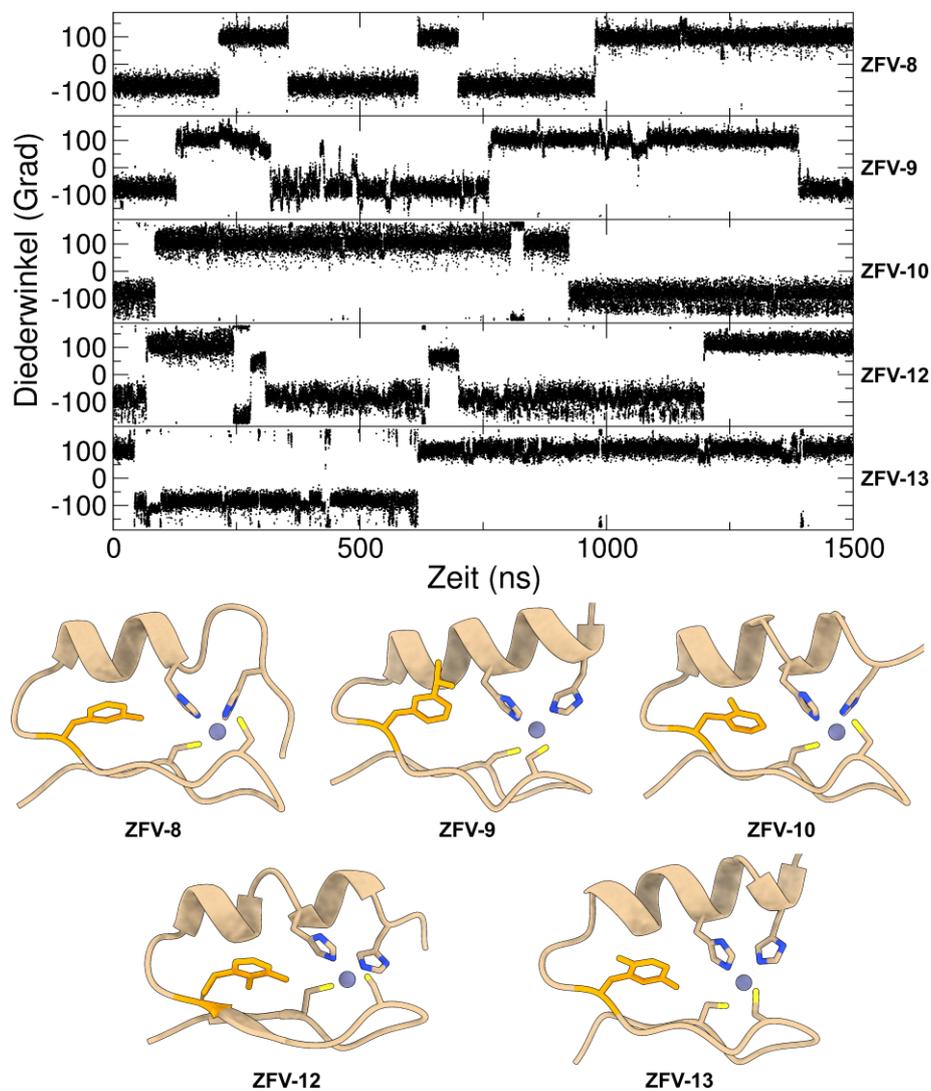


Abbildung 84: Ergebnisse der *wt*-Metadynamik von modifizierten Zinkfingerpeptiden. Die Zusammenfassung (oben) der χ_2 -Diederwinkel von X^{13} , die während der *wt*-Metadynamik beeinflusst wurden, zeigt dass für jedes Zinkfingerderivat mehrere Wechsel innerhalb des Simulationszeitraums stattfinden. Da eine selektive Anregung erfolgt, blieb die Tertiärstruktur der Mini-proteine intakt, beziehungsweise zeigte nur leichte Entfaltungen, was durch die dreidimensionale Struktur am Ende der Simulation belegt wird.

Die Auftragung der χ_2 -Torsionen in Abbildung 84 demonstriert, dass *wt*-Metadynamik die Simulation so manipuliert, dass eine Rotation von X^{13} zwar durchgeführt wird, die Tertiärstruktur jedoch erhalten bleibt. Insbesondere ZFV-9 und ZFV-10 zeigen eine große Ähnlichkeit zur Startstruktur. Anhand der Gegenüberstellung des χ_2 -Verlaufs lässt sich feststellen, dass die modifizierten Phenylalanine eine unterschiedliche Beweglichkeit im hydrophoben Kern des Zinkfingers besitzen. Während $Fm\epsilon^{13}$ in ZFV-8 mehrere Wechsel zwischen scharf definierten Bereichen um 100° und -100° durchführte, zeigte ZFV-9 ein unterschiedliches Verhalten. Zwar wurden die erwähnten Bereiche abgedeckt, jedoch scheint die Seitenkette eine größere Beweglichkeit zu besitzen, da auch Torsionen von 60° eingenommen wurden. Ein möglicher Grund liegt in einer leichten Dislokation des Phenylrings, wenn die *iso*-Propylgruppe nach Rotation des Rings zum Zinkfingerzentrum hineinzeigt. Laut NMR-Studien liegt diese Konformation nicht vor, beziehungsweise kann nicht detektiert werden, weshalb zusätzliche Informationen über die Anordnung der Seitenkette ausbleiben. Durch die vergrößerte sterische Anforderung des aliphatischen Rests müssen die Sekundärstrukturelemente ausweichen, um eine Beweglichkeit zu ermöglichen. Die Analyse der Strukturen aus der *wt*-Metadynamik zeigen, dass genau dies eintritt. Bei der Rotation von Fie^{13} um χ_2 weicht das Peptidrückgrat von K^{11} und R^{12} aus, wodurch eine Konformation erhalten wurde, bei der χ_2 einen Winkel von $60-70^\circ$ einnahm (Abbildung 85 roter Bereich). Diese Konformation scheint stabil zu sein, da sie für mehrere Pikosekunden bestehen blieb und mehrmals auftrat. Anschließend vollzog der Phenylring seine Rotation, wodurch der *iso*-Propylrest ins Innere des Zinkfingers zeigte. Durch den sterischen Anspruch des Substituenten wird die Seitenkette von L^{19} aus dem hydrophoben Kern verdrängt.

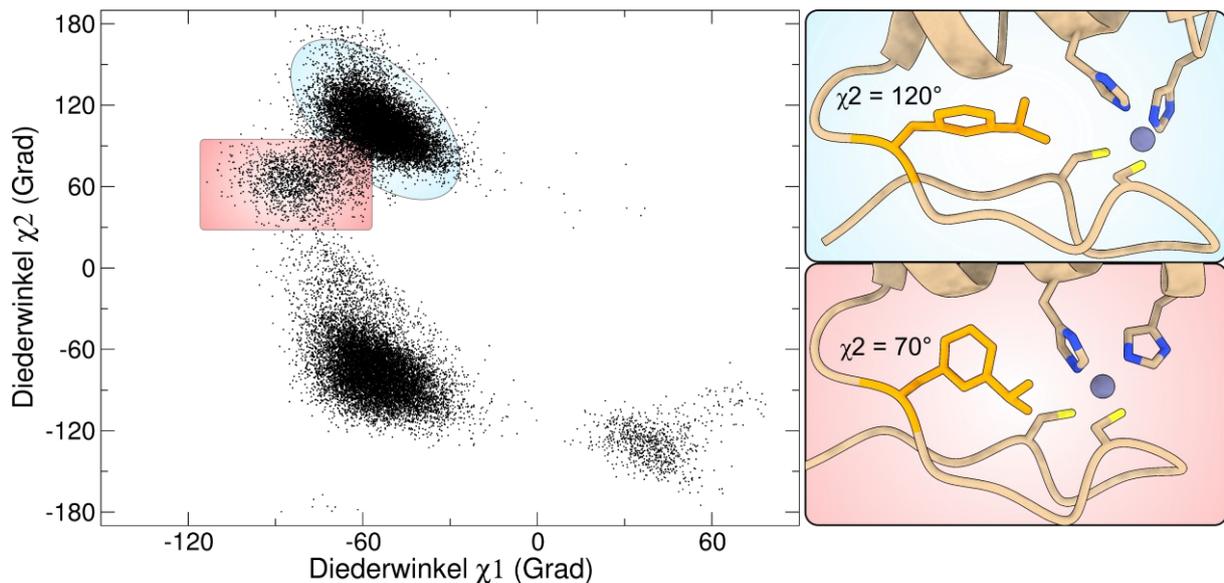


Abbildung 85: Mechanismus der Rotationsbewegung von Fie^{13} in ZFV-9. Die Auftragung von χ_1 und χ_2 gegeneinander zeigt ein Muster, das große Übereinstimmung zum nativen Phenylalanin in ZFV-1 aufzeigt (links). Dennoch wurde der rot-markierte Bereich nur in der Zinkfingervariante-9 abgedeckt und beschreibt die Ausrichtung des *iso*-Propylrests Richtung β -hairpin (rechts unten). Sowohl bei dieser Konformation als auch nach vollständiger Drehung in den Zinkfingerkern (rechts oben) ist eine Verzerrung des Rückgrats von K^{11} und R^{12} sichtbar.

Während der *wt*-Metadynamik von ZFV-10 wurden nur wenige Übergänge der χ_2 -Torsion erfasst. Diese Beobachtung scheint zunächst im Widerspruch zu den Ergebnissen der NMR-Spektroskopie dieses Zinkfingerpeptids zu stehen. Man könnte erwarten, dass die Verschiebung des Konformerenverhältnisses auf 70/30, mit einer höheren Frequenz der Winkeländerungen einhergeht. Jedoch gibt der Konformeranteil weniger Auskunft über Flexibilität der Seitenkette als vielmehr über den Energieunterschied der Minima. Daher steht der Verlauf des χ_2 -Diederwinkels von Fm δ^{13} in exzellenter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Die selektive Verbreiterung der Seitenkettensignale von Fm δ^{13} im ^1H -NMR-Spektrum deuteten auf einen dynamischen Prozess hin, der an der Grenze zum langsamen konformationellen Austausch steht. Demnach ist ein langsamer Wechsel, beziehungsweise eine geringere Anzahl an Übergängen der χ_2 -Torsion zu erwarten. Weiterhin sind die Bereiche um 100 und -100° weniger scharf definiert als in den vorherigen Derivaten, was auf eine größere Flexibilität der Seitenkette von Fm δ^{13} schließen lässt. Diese Beobachtung steuert einen zusätzlichen Teil zur Erklärung der selektiven Verbreiterung bei niedriger Temperatur im ^1H -NMR bei. Ein vergleichbarer Effekt auf die Beweglichkeit der Seitenkette übt die doppelte Methylierung von δ und ϵ in ZFV-12 aus. Sind die aliphatischen Reste zum Inneren des Zinkfingers ausgerichtet, so kann gerade in den letzten 250 ns der Simulation ein stark begrenzter Bereich, vergleichbar zum ZFV-8, beobachtet werden. Eine gegenüberliegende Anordnung der Methylgruppen in Fxp 13 , der Zinkfingervariante-13, führt erneut zur Verlangsamung der Torsionswechsel. Der Verlauf des χ_2 -Diederwinkels weist die gleichen Charakteristika wie ZFV-10 auf, was mit der experimentell bestimmten starken Verbreiterung bei Raumtemperatur für Fxp 13 übereinstimmt.

Der alleinige Informationsgewinn über die Dynamik der modifizierten Seitenketten aus Frequenz der χ_2 -Wechsel ist begrenzt. Ein großer Vorteil des Metadynamikformalismus ist die Möglichkeit, nach abgeschlossener Simulation die Energiefläche der untersuchten kollektiven Variable zu erhalten
Abbildung 86.

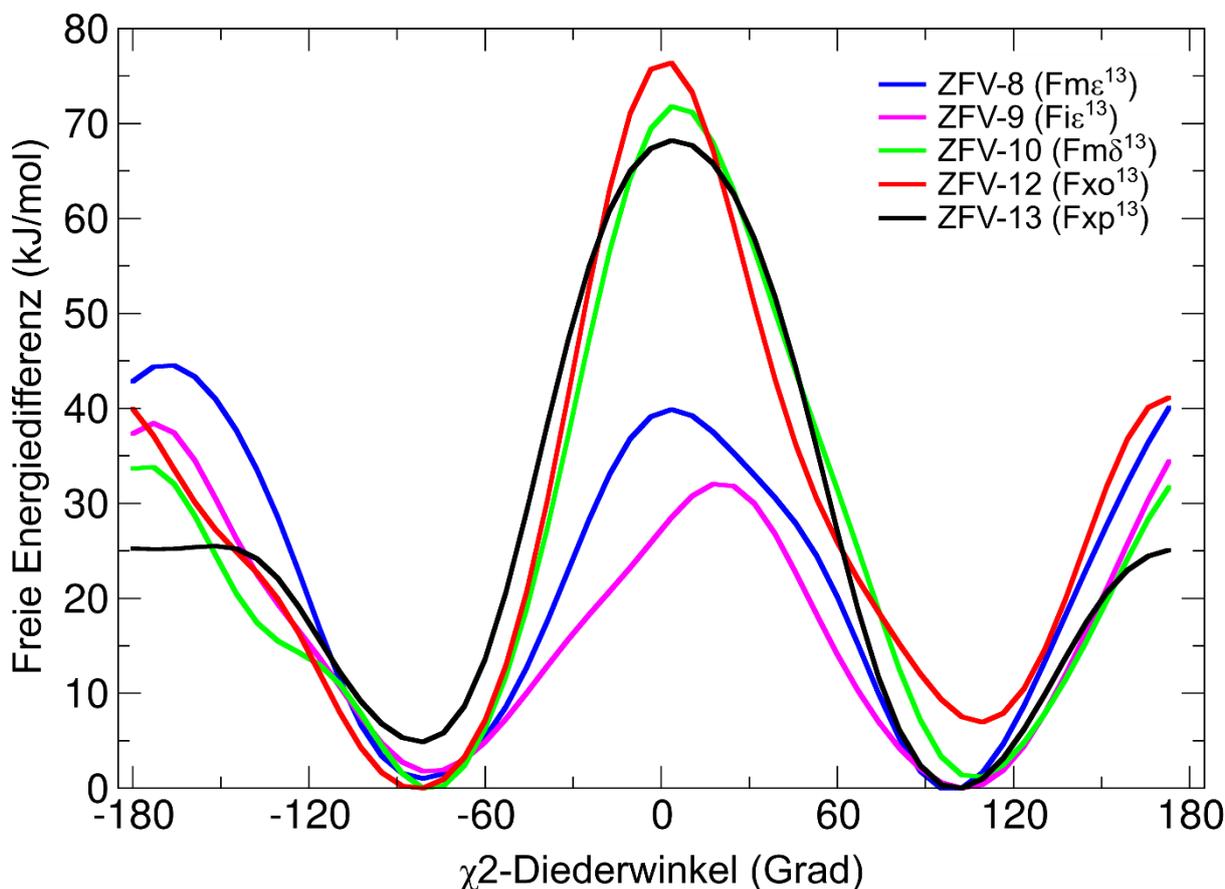


Abbildung 86: Freies Energieprofil entlang des χ^2 -Diederwinkels von X^{13} für verschiedene Zinkfingerderivate. Der Verlauf der freien Energie wurde direkt aus *wt*-Metadynamik erhalten.

Die Gegenüberstellung der χ^2 -Energieprofile von modifizierten Zinkfingerpeptiden in Abbildung 86 zeigt, dass die Einführung von Methylgruppen an unterschiedlichen Positionen die Dynamik der Seitenkette signifikant beeinflusst. Im Vergleich zu ZFV-1, dessen Energieprofil eine Barriere von 30 kJ/mol aufwies, wurde für ZFV-8 eine leichte Steigerung auf 40 kJ/mol verzeichnet. Das Konformerenverhältnis konnte durch die NMR-Spektroskopie qualitativ auf 95/5 bestimmt werden. Dies würde bedeuten, dass eine große Energiedifferenz der Minima zu erwarten ist. Beide Minima sind jedoch nahezu deckungsgleich in ihrem Energieniveau. Für diese Diskrepanz sind mehrere Gründe denkbar. Erstens muss erneut das Kriterium der Konvergenz der *wt*-Metadynamik gegeben sein. In Analogie zum Kapitel 3.1.6 wurde sowohl der Verlauf der Höhe des Gaußpotenzial als auch die Entwicklung der Energiefläche analysiert (Abbildung 87). Dabei wurde beobachtet, dass nach 700 ns kein hohes Potenzial mehr abgelegt wurde, was für eine Konvergenz spricht. Die Energiefläche zeigte jedoch ein uneindeutiges Verhalten. Bei 1000 ns wurde ein Energieprofil erhalten, dessen Minima eine Energiedifferenz von 7 kJ/mol zueinander aufweisen. Nach weiteren 500 ns wird dieser Unterschied nahezu vollständig ausgeglichen, sodass die Energiekurve aus Abbildung 86 erhalten wurde. Dieses Verhalten zeigt, dass keine komplette Konvergenz der *wt*-Metadynamik erreicht wurde, wodurch die Simulation verlängert werden sollte. Eine weitere plausible Erklärung für die Diskrepanz der NMR-Spektroskopie-Ergebnisse und der *wt*-Metadynamik könnte in der komplexen Umgebung des Zinkfingerpeptids liegen. Während in der makroskopischen Betrachtung die Zusammensetzung des

hydrophoben Kerns, beziehungsweise der benachbarten Aminosäuren, die geometrischen Anforderungen und damit auch die energetische Bewertung der Konformere angeben, können Fehler in Kraftfeldparametern oder der Startstruktur zu großen Ungenauigkeiten führen. Um die Auswirkung dieser Beeinträchtigungen zu minimieren, müssten multiple Simulationen, ausgehend von verschiedenen Startstrukturen und Positionen durchgeführt werden. Dieses Verfahren würde die Robustheit der Ergebnisse festigen. Dies würde für ein Derivat jedoch einen erheblichen Mehraufwand bedeuten, der aufgrund der begrenzten verfügbaren Ressourcen nicht gerechtfertigt werden konnte. Die Ausdehnung des Substituenten an der ϵ -Position (ZFV-9) resultierte in einem Energieprofil, das eine Rotationsbarriere ähnlich der nativen ZFV-1 aufweist. Dies widerspricht erneut den Erwartungen, da bereits in Grundvorlesungen der Organik gelehrt wird, dass der Steigerung des sterischen Anspruchs ein Anstieg der Energiebarriere folgen müsste. Während diese Aussage zuverlässig auf einfache Systeme angewandt werden kann, interferiert die Komplexität des Zinkfingers mit der Übertragbarkeit. Während der *wt*-Metadynamik wurde nur der χ_2 -Diederwinkel von X^{13} manipuliert, der χ_1 -Diederwinkel jedoch uneingeschränkt betrachtet. Dies würde der Seitenkette erlauben, aus dem hydrophoben Kern rauszudrehen, um anschließend eine Rotation durchzuführen. Die Beispielstrukturen aus Abbildung 85 zeigen jedoch, dass das Verhalten von Fie^{13} , bezüglich der Beweglichkeit um χ_1 , dem des nativen Phenylalanins entspricht.

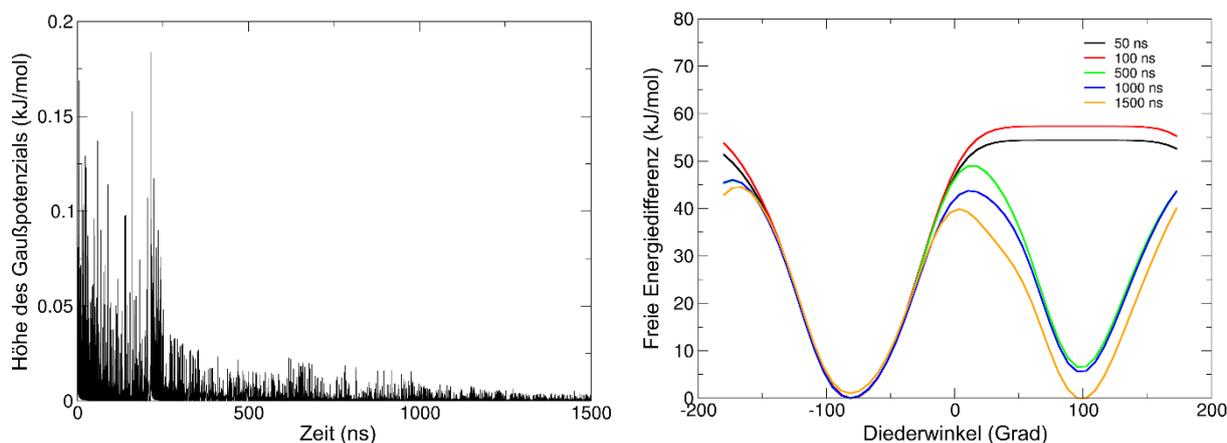


Abbildung 87: Konvergenzkriterien der *wt*-Metadynamik für ZFV-8. Die Höhe des Gaußpotenzials fällt nach kurzer Simulationsdauer rapide ab (links). Die Auftragung des freien Energieprofils (rechts) nach unterschiedlichen Abschnitten zeigt, dass im Bereich 500-1000 ns keine signifikante Änderung des Verlaufs entsteht, nach weiteren 500 ns jedoch eine Angleichung beider Minima erfolgt.

Nachdem die Ergebnisse der Metadynamiksimulationen für die ϵ -modifizierte Phenylalanine diskutiert wurden, sollen nun die weiteren Substitutionsmuster erörtert werden. ZFV-10 zeigt im Gegensatz zu den vorherigen Derivaten kein symmetrisches Energieprofil, sondern besitzt zwei unterschiedliche Energiebarrieren (Abbildung 86). Zwar ist die niedrigere Barriere im Vergleich zum nativen Phenylalanin in ZFV-1 mit 35 kJ/mol unbedeutend größer, demgegenüber steht jedoch eine massive Energiebarriere von 70 kJ/mol bei 0° . Diese Beobachtung erscheint zunächst plausibel, da die δ -Methylierung zu sterisch ungünstigen Wechselwirkungen mit den eigenen β -Protonen führt, falls die Rotation in diese Richtung abläuft. Die Analyse der entsprechenden Strukturen, während der *wt*-

Metadynamik zeigten jedoch, dass die Methylgruppe entlang der β -Protonen, Richtung α -Helix rotiert. Dies ist der χ_1 -Ausrichtung der Phenylgruppe geschuldet, da eine Rotation Richtung β -sheet erhebliche strukturelle Verzerrungen erfordern würde, die zu einer Destabilisierung des β -hairpins führen. Daher kann die Schlussfolgerung getroffen werden, dass eine bevorzugte Rotationsrichtung für Fm δ^{13} vorliegt. Diese Beobachtung kann auch für den Fxo-Baustein getroffen werden. Die *syn*-artige Methylierung der δ - und ϵ -Position führt zu einem Energieprofil, dessen Eigenschaften als Summe von ZFV-8 und ZFV-10 aufgefasst werden können. Das Derivat besitzt eine niedrige Energiebarriere bei 180° mit 40 kJ/mol und den höchsten Wert sämtlicher Zinkfingervarianten mit 75 kJ/mol bei 0° . Somit zeigt die Phenylgruppe erneut eine bevorzugte Rotationsrichtung. Erstmals konnte eine signifikante Differenz zwischen den beiden Minima beobachtet werden, was in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen aus der NMR-Spektroskopie steht. ZFV-13 zeigt ein Energieprofil, dessen Charakteristika am auffälligsten sind. Die Substitution der δ -Position mit einer Methylgruppe bedingt eine bevorzugte Rotationsrichtung, was durch die hohe Energiebarriere bei 0° belegt wird. Für diese Zinkfingervariante wurden selbst bei Raumtemperatur extreme selektive Verbreiterungen für die Signale der Fxp 13 -Seitenkette im ^1H -NMR beobachtet. Als möglicher Grund wurde hierbei eine verlangsamte Dynamik innerhalb des hydrophoben Kerns identifiziert. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde eine Energiebarriere von 25 kJ/mol bei 180° verzeichnet, die niedriger ist als beim nativen Phenylalanin der Zinkfingervariante-1. Die überraschend niedrige Barriere ermöglicht eine nahezu ungehinderte Rotation des Phenylrings, wobei die Substituenten größere strukturelle Verzerrungen erfordern. Somit besteht zwischen den Ergebnissen der *wt*-Metadynamik und der NMR-Spektroskopie eine gute Übereinstimmung. Zusätzlich können durch Strukturbilder während der Rotation, die Aminosäuren identifiziert werden, die einer Verzerrung unterliegen. Die Analyse der Konvergenz von ZFV-13 zeigte, dass bei 1500 ns erneut ein hohes Gaußpotenzial abgelegt wurde. Daher wurde die Simulation um 500 ns elongiert, wobei keine Veränderung des Energieprofils beobachtet wurde. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Simulation konvergierte.

Die Ergebnisse dieses Kapitels lassen folgendes Resümee über die korrelierte Dynamik des hydrophoben Kerns eines Cys $_2$ His $_2$ -Zinkfingerpeptids zu: Der Einbau von aliphatisch-modifizierten Phenylalaninderivaten in den hydrophoben Kern von Zinkfingerpeptiden führte zu Beobachtungen in der NMR-Spektroskopie, die alleinig durch diese Methode nicht vollständig aufgeklärt werden konnten. Als plausibler Mechanismus wurde die Rotation um χ_2 identifiziert, die anschließend durch *wt*-Metadynamiksimulationen beschrieben werden sollte. Dadurch konnte festgestellt werden, dass jede Modifikation zu einer unterschiedlichen Mobilität der Seitenkette führt. Während Substitutionen der ϵ -Position gut toleriert wurden und ein einheitliches NMR-Spektrum lieferten, zeichneten Simulationen dieser Zinkfingervarianten ein gemischtes Bild. Die Energiebarriere wurde erwartungsgemäß vergrößert, dennoch stehen die Ergebnisse der *wt*-Metadynamik mit den Beobachtungen der NMR-Spektroskopie im Widerspruch, da das Konformerenverhältnis von 95/5 einen großen Unterschied zwischen den Minima bedingt, was jedoch in der Simulation nicht abgebildet wurde. Die Diskrepanz

kann durch verschiedene Einflüsse erklärt werden. Zum einen steuern komplexe Umgebungseffekte zur energetischen Bewertung der Minima bei, zum anderen enthält auch die ω -Metadynamik gewisse Limitationen. Weiterhin besteht eine Abhängigkeit der Beweglichkeit des Phenylrings zur χ_1 -Torsion. Um die Robustheit der Ergebnisse zu erhöhen, müssten weitere Simulationen, ausgehend von unterschiedlichen Startstrukturen durchgeführt werden. Durch den Einbau von δ -methylierten Phenylalaninen wurde eine temperaturabhängige selektive Verbreiterung im $^1\text{H-NMR}$ der aromatischen Protonen von $\text{Fm}\delta^{13}$ beobachtet. Metadynamiksimulationen brachten Belege für die Verbreiterung hervor, da neben einer niedrigen Energiebarriere auch eine geringe Anzahl an Rotationen festgestellt werden konnte. Weiterhin wurde eine Vorzugsrichtung für die Drehung des Phenylrings um χ_2 identifiziert. Entgegen den Erwartungen aus der NEWMAN-Projektion,^[462] drehen sämtliche δ -modifizierte Phenylalanine nicht über $\chi_2 = 0^\circ$, sondern über die sterisch anspruchsvolleren β -Protonen. Der Grund liegt hierbei in einer Kombination aus der Zusammensetzung der Umgebung und der Anordnung des Phenylrings. Durch die Ausrichtung der δ -substituierten Seitenkette wird eine Rotation in Richtung β -hairpin, wie sie bei den ε -modifizierten Derivaten energetisch günstig ist, durch das Rückgrat der benachbarten Aminosäure (R^{12}) blockiert. Dadurch bleibt dem Ring keine andere Möglichkeit, als in Richtung der α -Helix zu drehen. Auch ZFV-12 und ZFV-13 zeigen aufgrund ihrer δ -Substitution diese Verhaltensweise, wobei ZFV-12 erstmalig eine Energiedifferenz zwischen den beiden Minima aufweist. Die gegenüberliegende Methylierung (Fxp^{13}) resultierte in einem Energieprofil mit einer niedrigeren Energiebarriere, als sie beim nativen Phenylalanin beobachtet wurde. Die daraus entstehende nahezu ungehinderte Rotation liefert in Kombination mit den strukturellen Verzerrungen, durch den sterischen Anspruch der Substituenten, eine gute Erklärung für die selektive Verbreiterung der Signale im $^1\text{H-NMR}$ bei Raumtemperatur. Diese vielversprechenden Erkenntnisse, die für die Dynamik des Zinkfingerpeptids durch eine Verknüpfung des systematischen Methylhüpfens und Simulationen gewonnen wurden, heben die Bedeutung dieser Methode für weitere Miniproteinsystem hervor.

3.2.13 Beeinflussung der Rotationsdynamik des zentralen Phenylrings durch symmetrische Modifikationen

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.11 demonstrierten die Fülle an zusätzlichen Informationen, den der Symmetriebruch einer degenerierten Rotation liefern kann. Als Motivation für diese synthetischen Modifikationen diente der geringe Temperaturbereich von Zinkfingerpeptiden, der eine Charakterisierung der Rotation nach WÜTHRICH *et al.* verhinderte.^[435] Während manche Proteine in cryoprotektiven Lösungsmittelgemischen ihre Tertiärstruktur ausbilden können, sind Zinkfinger durch die benötigten Faltungsbedingungen (Zn^{2+} , $\text{pH} > 5.5$, reduktive Umgebung) in ihrer Lösungsmittelzusammensetzung stark eingeschränkt. Sollte dennoch der Versuch unternommen werden, die Dynamik von Phe^{13} im hydrophoben Kern durch Temperaturgradienten zu charakterisieren,

müsste die Energiebarriere auf solch ein Niveau angehoben werden, dass die Grenze zum langsamen konformationellen Austausch erreicht ist. Im Kontrast zu den Derivaten der vorherigen Kapitel, müssten die Modifikationen der Seitenkette symmetrisch erfolgen. Dabei ist entweder die doppelte Substitution der δ - und ϵ -Positionen oder Kombination aus δ und ϵ denkbar (Abbildung 88).

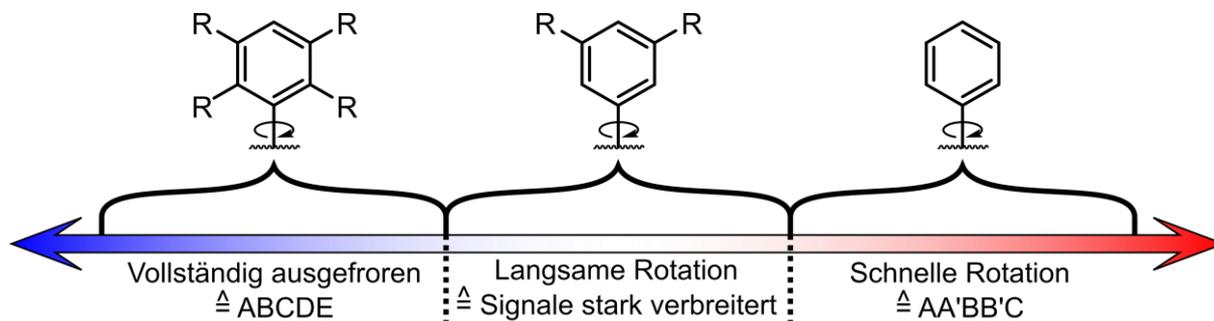


Abbildung 88: Beeinflussung der Rotationsbarriere durch symmetrische Modifikationen des Phenylrings. Da die Rotation des nativen Phenylalanins um χ_2 bei Temperatur sehr schnell ist, wird ein AA'BB'C-Spin-System beobachtet. Der geringe Temperaturbereich des Zinkfingerpeptids (geschweifte Klammer { }) erfordert die Anpassung der Energiebarriere durch symmetrische Substitutionen des Rings. Dadurch kann das System in Bereiche verschoben werden, in denen eine Rotation so stark verlangsamt ist, dass eine signifikante Verbreiterung der Signale beobachtet wird. Weitere Modifikationen könnten sogar ein vollständiges Ausfrieren herbeiführen, was zu einem ABCDE-Spin-System führen könnte.

Dem Konzept aus Abbildung 88 folgend, sollten nun Derivate postuliert werden, die nicht nur ein geeignetes Substitutionsmuster tragen, sondern synthetisch einfach zugänglich sind. Da die NEGISHI-Kreuzkupplung^[452] ausgezeichnete Ausbeuten für asymmetrisch modifizierte Phenylalanine lieferte, richtete sich die Suche nach möglichen Kombinationen auf die Kompatibilität der etablierten Synthesestrategie, ausgehend von Boc-Iod-L-Ala-OMe und den entsprechenden Aryliodiden aus (Abbildung 89).

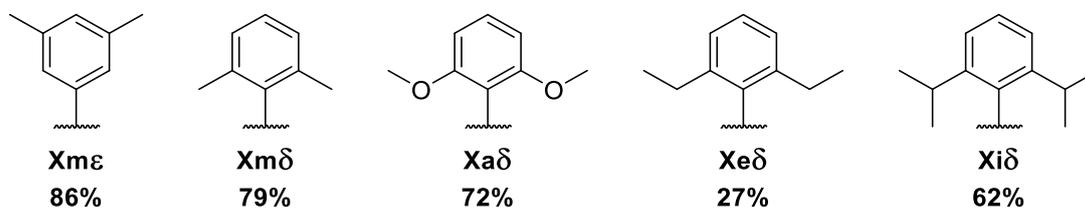


Abbildung 89: Zusammenfassung der symmetrisch modifizierten Phenylalaninderivate, die im Rahmen dieser Arbeit dargestellt wurden. Die Nomenklatur orientiert sich an dem Dreibuchstabencode, wobei der erste Buchstabe X von Xylol abgeleitet ist, und die symmetrische doppelte Modifikation kennzeichnet. Der zweite Buchstabe definiert die Art der Modifikation, gefolgt von der Position. Die angegebene Ausbeute bezieht sich auf den NEGISHI-Kreuzkupplungsschritt nach den optimierten Bedingungen von ROSS *et al.*^[453]

Vor der Durchführung der Synthese stellt sich erneut die Frage nach der Nomenklatur der Bausteine (s. Kapitel 3.2.8). Angelehnt an die im Rahmen dieser Arbeit etablierten asymmetrischen *building blocks*, wurde ein Dreibuchstabencode erstellt, der eine eindeutige Bezeichnung erlaubt. Während bei den asymmetrischen Derivaten die Zusammensetzung aus Grundgerüst, Art der Modifikation und Position bestand, kann diese Charakterisierung aufgrund des beidseitigen Substitutionsmusters nicht verwendet werden. Eine mögliche Variante ist, diese Anordnung direkt in den ersten Buchstaben einzubeziehen.

Eine isolierte Betrachtung der Seitenkette zeigt, dass die Bausteine formell als *meta*-Xylyl-Derivate aufgefasst werden können. Daher wurde für den ersten Buchstabe "X" als Zeichen ausgewählt. Die restlichen Positionen ergeben sich nach dem etablierten Schema: Der zweite Buchstabe definiert die Art der Substitution und steht im guten Einklang mit dem organisch-chemischen Verständnis (*m* = Methyl, *e* = Ethyl, *i* = *iso*-Propyl). Einzig allein die Dimethoxy-Verbindung fällt aus dem Muster heraus. Hier bietet sich der Buchstabe *a* an, da dieser einen Bezug zur Stoffklasse der Anisole herstellt. Der dritte Buchstabe kennzeichnet, unter den Rahmenbedingungen eines symmetrischen Substitutionsmusters die Position der Modifikationen am Ringsystem. Nach Betrachtung der synthetisierten Bausteine mag die Frage aufkommen, warum die doppelte Modifikation der ϵ -Position durch nur eine Variante vertreten wird. Dem geneigten Leser sei hierbei das anschließende Kapitel als Begründung zu nennen. Die vier δ -substituierten Derivate beziehungsweise ihre Ausbeute demonstrieren erneut das Potenzial, das die NEGISHI-Kreuzkupplung für die Darstellung sterisch anspruchsvoller Derivate bietet.^[452] Dies zeigt sich vor allem in dem geringen Unterschied bezüglich der Ausbeute zwischen $Xm\epsilon$ und $Xm\delta$, die in beiden Fällen im sehr guten Bereich liegt. Eine deutliche Steigerung der Elektronendichte scheint keinen beziehungsweise nur einen leicht negativen Effekt zu haben, da $Xa\delta$ in guter Ausbeute erhalten wurde. Der starke Einbruch der Ausbeute bei $Xe\delta$ lässt sich wie folgt erklären: Zunächst wurde der Fokus auf die Identifikation eines Substitutionsmuster mit interessanten Eigenschaften bezüglich des Zinkfingerfaltungsmotivs gesucht. Daher erfolgte die Syntheseroute in einem solchen Maßstab, dass selbst bei geringer Ausbeute genügend Baustein für die Darstellung eines Zinkfingerpeptids vorhanden wäre. Nachdem $Xe\delta$ synthetisiert und die schlechte Ausbeute bestimmt wurde, wurden Anpassungen bezüglich der Temperatur für die Synthese von $Xi\delta$ vorgenommen. Eine Erhöhung auf 50 °C ermöglichte es, das sterisch deutlich anspruchsvollere Derivat in beachtlichen 62% zu erhalten. Würde die Syntheseroute für $Xe\delta$ unter diesen optimierten Bedingungen erneut durchgeführt, kann eine erhöhte Ausbeute erwartet werden. Nach erfolgreicher Darstellung der symmetrisch modifizierten Bausteine, wurden die Schutzgruppen durch eine Totalhydrolyse in 6M HCl bei 100 °C entfernt. Anschließend konnten die unnatürlichen Aminosäuren in die entsprechende Fmoc-geschützte *building blocks* überführt werden. Die Vollständigkeit und Reinheit jeder Verbindung wurde durch NMR-Spektroskopie und Massen-Spektrometrie gesichert, was die Grundlage für den Einbau in den $\beta\beta\alpha$ -Zinkfinger bildete und in den folgenden Kapiteln näher betrachtet werden soll (Abbildung 90).

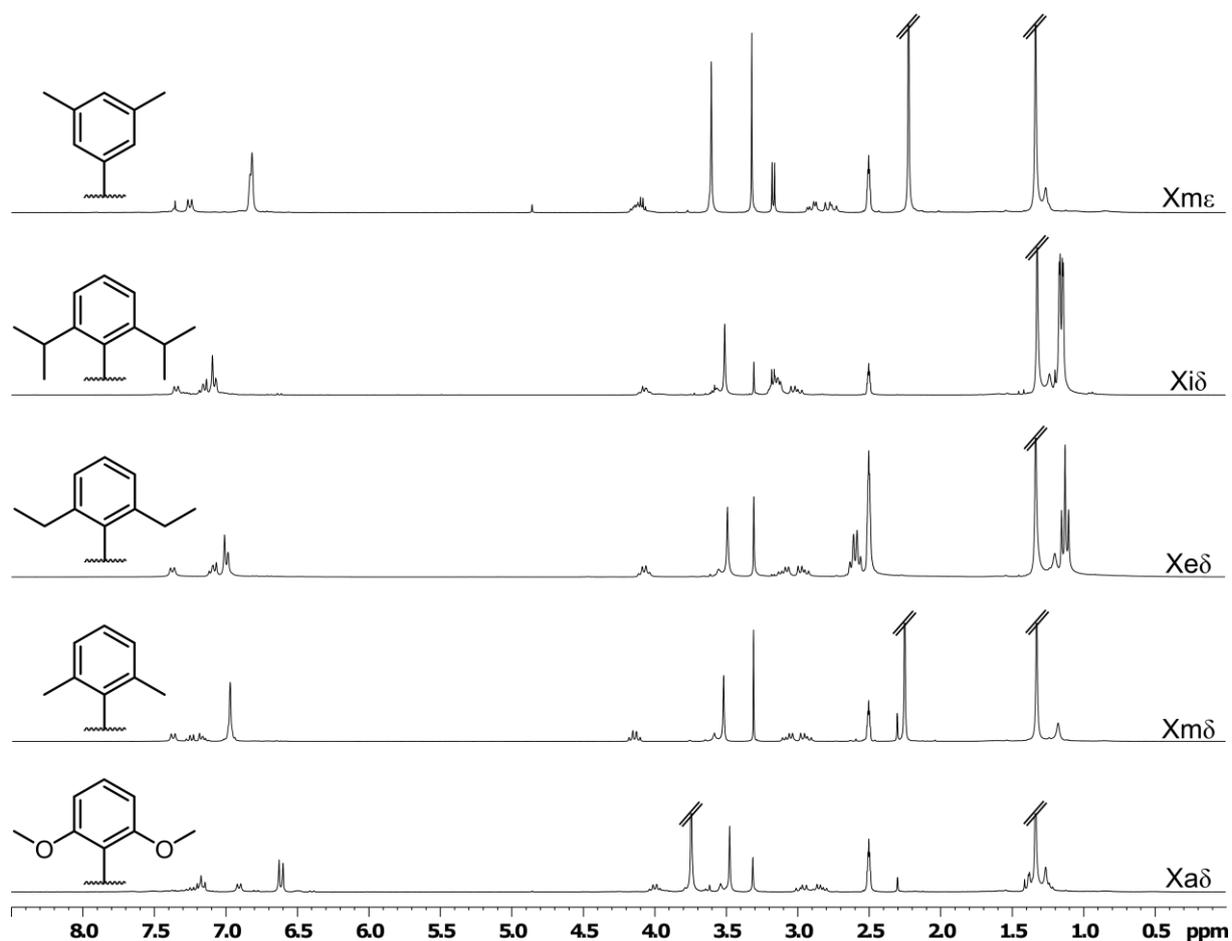


Abbildung 90: NMR-spektroskopische Gegenüberstellung der Boc- und Methylester-geschützten doppelt modifizierten Phenylalaninderivate 14-18. Um eine gute Abbildbarkeit zu gewährleisten, wurden die Signale mit hoher Intensität abgeschnitten. NMR-Bedingungen: 300 MHz, DMSO-d_6 , 300 K.

3.2.14 Die geringe Toleranz von synthetischen Aminosäuren mit doppelter Modifikation der ϵ -Position in Zinkfingerpeptiden - Der Xme -Baustein

Zunächst soll sich der Einführung des Xme -Bausteins an der Position 13 der Zinkfingersequenz vom 3YY1 gewidmet werden. Zusätzlich wurde Hot=Tap bei sämtlichen folgenden Zinkfingervarianten als *turn*-Mimetikum für die Positionen sieben und acht eingebaut. Nach erfolgreicher Festphasenpeptidsynthese wurde das Rohpeptid mittels *rp*-HPLC isoliert, wobei eine signifikante Erhöhung der Lipophilie beobachtet wurde, da das Peptid bei dem gewählten Gradienten von 10 auf 40% in 10 Minuten fast eine Minute später eluierte. Die Aufnahme eines ^1H -NMR-Spektrums von 2.0 mg des gereinigten Zinkfingerpeptids in wässriger Lösung führte zu einem klar definierten Signalmuster, dass der *apo*-Variante der vorherigen Zinkfinger entspricht. Zweidimensionale TOCSY- und NOESY-Methoden erlaubten die vollständige Zuordnung der Verbindung (Abbildung 91 unten).

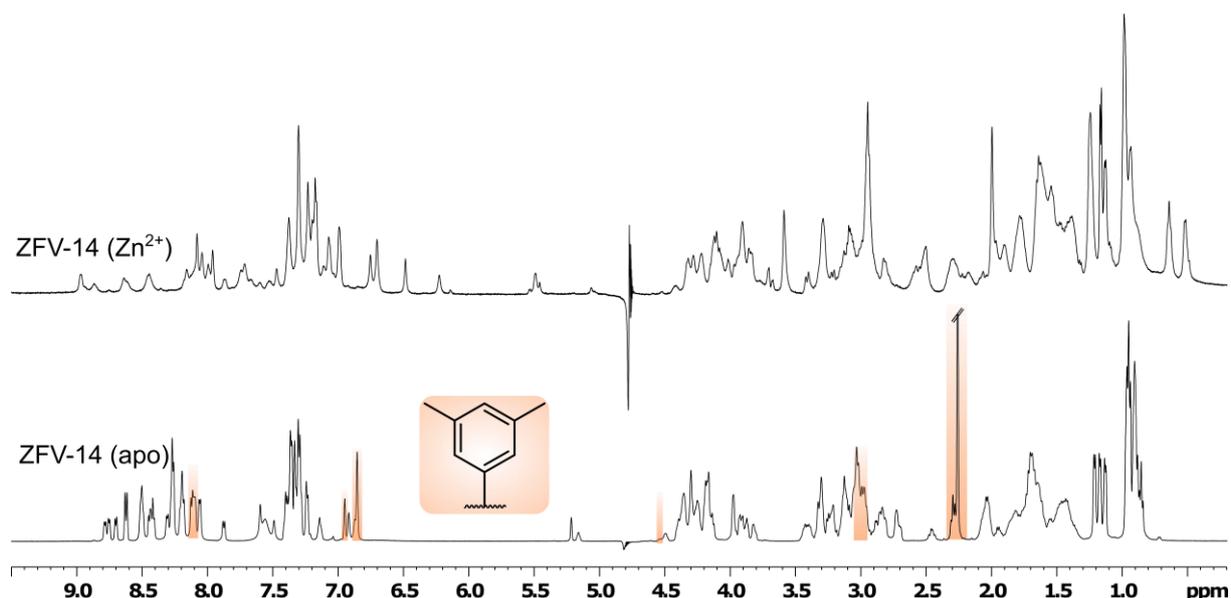


Abbildung 91: NMR-Spektren der Zinkfingervariante-14. Die *apo*-Verbindung (unten) zeigt ein klar definiertes Signalmuster, das vollständig zugeordnet werden konnte. Die Signale für $Xm\epsilon^{13}$ sind orange hervorgehoben. Nach Zugabe von 1.5 eq. Zn^{2+} und Erhöhung des pH-Werts wurde ein Muster erhalten, das charakteristische $\beta\beta\alpha$ -Zinkfingererschiebungen aufweist, durch seine geringe spektroskopische Qualität jedoch nicht zugeordnet werden konnte.

Die Zinkfingervariante-6, dessen 13. Position mit ϵ,ϵ' -Di-Brom-Tyrosin mutiert wurde, führte nach Zugabe von Zn^{2+} und Erhöhung des pH-Werts zu einem Spektrum, dessen Signalmuster auf eine Aggregation des Peptids hindeutete (Abbildung 69). Dementsprechend waren die Erwartungen auf eine vollständige Faltung von ZFV-14 unter den etablierten Bedingungen sehr gering. Zwar wurde ein Spektrum erhalten, das eindeutige $\beta\beta\alpha$ -strukturtypische Signale enthielt, jedoch waren 512 Scans notwendig, um eine qualitativ auswertbare Abbildung zu erhalten. Die geringe spektroskopische Qualität verhinderte die Zuordnung durch zweidimensionale NMR-spektroskopische Methoden. Hierbei tritt die Frage in den Vordergrund, warum $Xm\epsilon^{13}$ eine stabile Faltung verhindert. Schließlich zeigte $Fm\epsilon^{13}$ (ZFV-8) die thermodynamisch stabilste Verbindung sämtlicher in dieser Arbeit untersuchten Zinkfingerpeptide. Hierfür lassen sich zwei plausible Erklärungen finden: Zum einen zeigten die asymmetrisch-substituierten Bausteine, dass die ϵ -Position zwar bereitwillig in der Faltung toleriert wird, das Konformerenverhältnis der χ_2 -Seitenkettenrotation von X^{13} jedoch bei mindestens 95/5 liegt. Somit scheint die Ausrichtung der Methylgruppe in den Zinkfingerkern energetisch stark ungünstig zu sein. Würde $Xm\epsilon^{13}$ mit seiner symmetrischen Doppelsubstitution an die gleiche Position im Zinkfingermotiv eingebaut werden, müsste eine Methylgruppe permanent ins Innere der Tertiärstruktur hineinzeigen und ultimativ die Faltung destabilisieren. Würde die Seitenkette eine andere Orientierung, außerhalb des Zinkfingerzentrums aufweisen, würde dies zum Kollaps des hydrophoben Kerns und damit zum Ausbleiben eines zentralen faltungsstabilisierenden Strukturelements führen. Eine weitere Erklärung liegt in der langsamen Rotation von $Xm\epsilon^{13}$ um χ_2 , verbunden mit den strukturellen Verzerrungen umliegender Strukturfragmente. Dies beruht auf der Annahme, dass $Xm\epsilon^{13}$ zentraler Bestandteil des hydrophoben Kerns ist und rotieren kann. Beide Varianten sind denkbar, wobei ersteres durch die bisherigen Beobachtungen als wahrscheinlicher gilt.

3.2.15 Charakterisierung von symmetrischen δ -Modifikationen des zentralen Phenylrings in Zinkfingerpeptiden

Aufbauend auf den Erkenntnissen der Flexibilität von δ -asymmetrisch modifizierten Phenylalaninderivaten wurde die Chance für eine stabile Faltung von δ -symmetrisch substituierten Bausteinen im Vergleich zum $Xm\epsilon^{13}$ als höher eingestuft. Die Integration sämtlicher δ -modifizierter Bausteine erfolgte problemlos und resultierte in mehrere Milligramm sauberer Zinkfingerpeptide. Der Einfluss der gesteigerten Lipophilie für $Xi\delta^{13}$ verlangte zudem einen steileren *rp*-HPLC-Gradienten auf 20-40%MeCN, um eine effektive Elution des Peptids zu gewährleisten. Die Vollständigkeit und Reinheit der jeweiligen Sequenz wurden durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie bestätigt. Die Anpassung der Lösungsmittelzusammensetzung (1.5 eq. Zn^{2+} , pH > 6.5) führte bei allen Zinkfingervarianten dieses Kapitels zur Ausbildung eines Signalmusters mit Indikation zum $\beta\beta$ -Strukturmotiv. Dabei wird zunächst der Fokus auf ZFV-15 ($Xm\delta^{13}$) und ZFV-16 ($Xa\delta^{13}$) gelegt, da die Phenylalaninderivate durch ihre Methyl- beziehungsweise Methoxygruppen nur eine geringe sterische Ausdehnung aufweisen und zusätzlich scharfe Singulets für die Substituenten liefern (Abbildung 92).

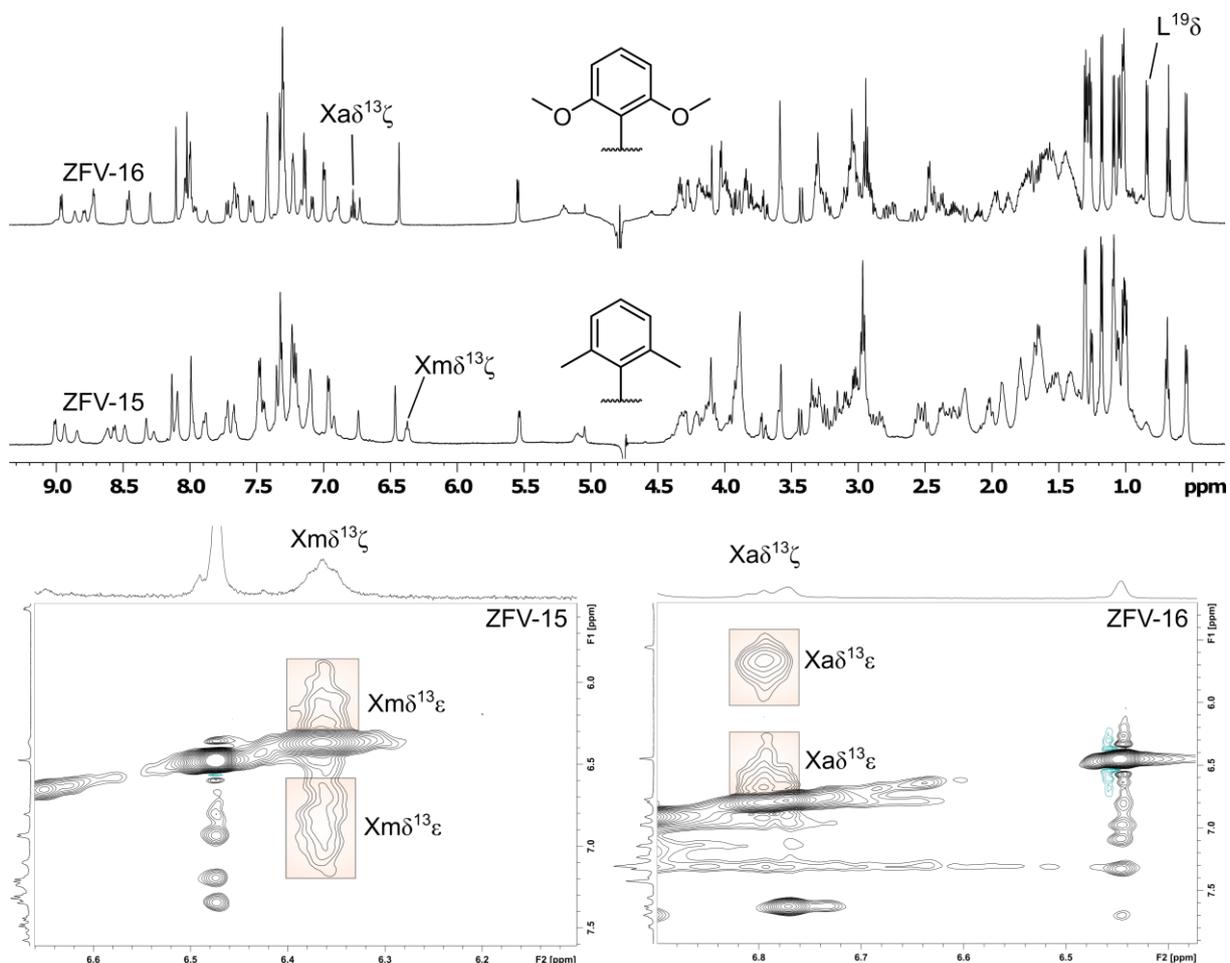


Abbildung 92: Vergleich der NMR-Spektren von Zinkfingervariante-15 und 16. Die ¹H-Spektren (oben) beider Zinkfingerpeptide unter den Faltungsbedingungen zeigen die für das $\beta\beta$ -Strukturmotiv typischen Signalmuster. Die Analyse der X^{13} -Seitenketten ermöglichte nur die eindeutige Identifikation der ζ -Protonen. Die jeweiligen NOESY-Spektren (unten) enthüllten jedoch stark verbreiterte Kreuzsignale, die Anzeichen für die entsprechenden ϵ -Protonen geben.

Der Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (Abbildung 92) beider Zinkfingervarianten demonstriert, dass Phenylalaninderivate mit symmetrisch substituierten δ -Positionen eine stabile Faltung ausbilden können. Dies erlaubt die Annahme, dass beide Seitenketten Teil des hydrophoben Kerns sind. Eine Kombination aus TOCSY- und NOESY-Methoden erlaubte zudem die nahezu vollständige Zuordnung beider Peptide. Vom besonderen Interesse sind die Protonen der X^{13} -Seitenkette. Das aromatische X^{13} - ζ -Proton beider Derivate konnte anhand seiner Multiplizität und Verschiebung eindeutig identifiziert werden. Mit 6.78 ppm liegt es im ZFV-16 erstaunlich weit im Tieffeld, was auf den +M-Effekt der Methoxygruppen in *ortho*-Position zurückgeführt werden kann. ZFV-15 zeigt eine ζ -Verschiebung von 6.38 ppm, die vergleichbar mit anderen Zinkfingerpeptiden ist. Von größerem Interesse sind die ϵ -Protonen beziehungsweise die Signale der Substituenten des Phenylrings, da eine Verbreiterung Hinweise auf eine langsame Rotation geben würde. Jedoch ist bei normaler Intensität für beide Zinkfingervarianten kein Kreuzsignal vom ζ zu ϵ zu beobachten. Erst die Erhöhung der Kontourlevel brachte im Fall von ZFV-16 Signalgruppen hervor, die den entsprechenden ϵ -Protonen zugeordnet werden konnten (Abbildung 92). Das NOESY-Spektrum bestärkte diese Vermutung, wobei die fraglichen Kreuzsignale eine größere Auflösung und Intensität besitzen. Auch ZFV-15 zeigte im NOESY-Spektrum eine extreme Signalverbreiterung der ϵ -Protonen. Somit kann die Hypothese formuliert werden, dass beide Zinkfingerpeptide wahrscheinlich genau in den Bereich der langsamen Rotation liegen, wodurch eine starke Signalverbreiterung hervorgerufen wird (s. Abbildung 88). Um weitere Belege für die postulierte Rotationsmobilität zu finden, wurden Temperaturreihen aufgenommen. ZFV-15 demonstriert hierbei eine begrenzte thermodynamische Stabilität, da bereits bei 310 K das Signal-Rausch-Verhältnis signifikant erniedrigt wurde. Im Kontrast dazu zeigte ZFV-16 selbst bei 320 K noch Signale mit definierter Multiplizität, was überraschend ist, da der vergrößerte sterische Anspruch die Faltung destabilisieren sollte. Beide Derivate zeigten keine zusätzlichen Signale bei Erhöhung oder Erniedrigung der Temperatur, die als ϵ -Protonen identifiziert werden konnten. Zweidimensionale NMR-Spektroskopie bei tieferer Temperatur zeigte hingegen, dass die Signalbreite der Kreuzsignale der vermuteten ϵ -Protonen temperaturabhängig ist, was zur korrelierten Dynamik des $X\delta^{13}$ passen würde. Unabhängig von der Temperaturstabilität zeigt ZFV-16 ein weiteres Merkmal, dem Aufmerksamkeit gewidmet werden soll. Während ein Großteil der Zinkfingerpeptide, die in dieser Arbeit charakterisiert wurden, eine Verschiebung des $L^{19}\delta$ -Protons von 1.10 ppm aufzeigten, ist der aliphatische Rest in ZFV-16 mit 0.89 ppm ins Hochfeld verschoben. Eine mögliche Ursache liegt hierbei in der Orientierung der Seitenkette von $X\delta^{13}$. Durch eine spezielle Ausrichtung könnten Wechselwirkungen zwischen dem Phenylring und der L^{19} -Seitenkette erfolgen, die eine entsprechende abschirmende Wirkung zur Folge hätte. Zwar wäre es denkbar, dass eine neuartige Zusammensetzung des hydrophoben Kerns erfolgte, die in den entsprechenden Verschiebungen resultieren würde, die exzellente thermodynamische Stabilität von ZFV-16 entkräftet jedoch dieses Postulat. Da ZFV-16 das einzige Zinkfingerpeptid mit symmetrischer Modifikation des Phenylrings an Position 13 ist, das ausreichende NOE-Kreuzsignale zur Erstellung von NMR-*restraints* enthält, wurde ein entsprechendes

Strukturensemble erstellt, um die Hypothesen bezüglich der Zusammensetzung des hydrophoben Kerns zu überprüfen (Abbildung 93). Die Berechnung erfolgte ohne *restraints* für die Orientierung der Seitenkette von $\text{Xa}\delta^{13}$, da keine Kreuzsignale identifiziert werden konnten.

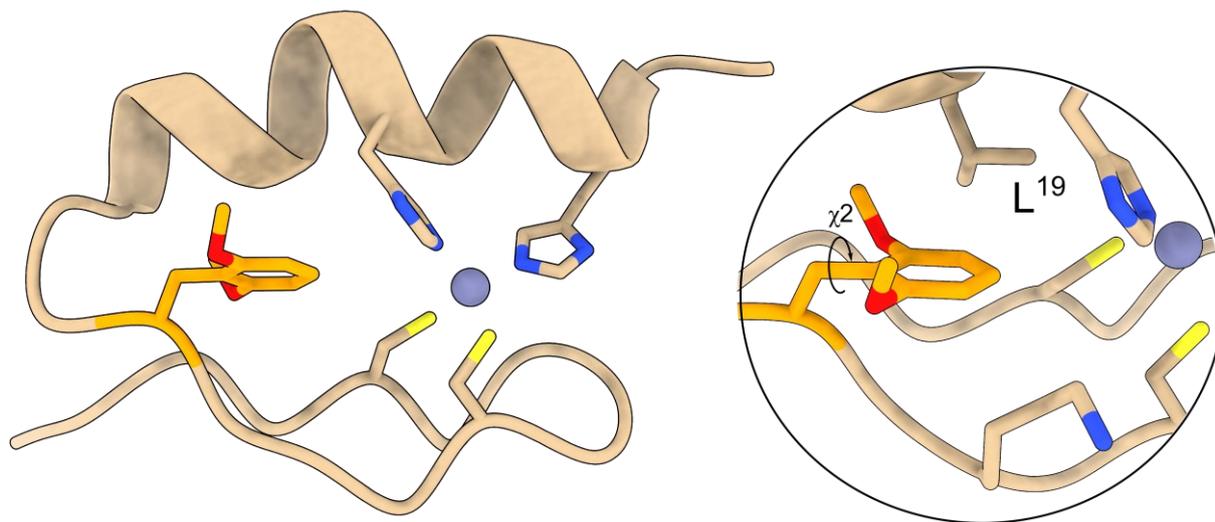


Abbildung 93: NMR-Strukturensemble von ZFV-16. Die Auswertung der Kreuzsignale des NOESY-Spektrums ermöglichte die Generierung einer NMR-Struktur von ZFV-16. Zwar zeigt dieses Peptid die klassische $\beta\beta$ -Zinkfingerstruktur, jedoch ist eine erhebliche Verzerrung des β -hairpins im Vergleich zu anderen Zinkfingern beobachtbar. Die genauere Betrachtung des hydrophoben Kerns (rechts) zeigt eine Dislokation vom Zentrum des Peptids, wodurch L^{19} eine zentralere Rolle einnimmt. Durch eine Rotation um χ_2 könnte der Phenylring (orange) in eine Anordnung gelangen, die einen starken Ringstromeffekt zur L^{19} -Seitenkette begünstigt.

Das Konformer in Abbildung 93 mit der geringsten Energie enthüllt das vermutete $\beta\beta$ -Strukturmotiv für ZFV-16. Die genauere Betrachtung der Zusammensetzung des hydrophoben Kerns erklärt die große Hochfeldverschiebung der $\text{L}^{19}\delta$ -Protonen. Durch den hohen sterischen Anspruch der Substituenten von $\text{Xa}\delta^{13}$ wird der Phenylring von seiner ursprünglichen Position verdrängt. Da keine NOE-Kontakte für die Seitenkette von $\text{Xa}\delta^{13}$ vorhanden waren, gibt die NMR-Struktur nur eine mögliche Ausrichtung dar. Die Flexibilität um χ_2 ermöglicht eine Orientierung des Phenylrings zur aliphatischen Seitenkette von L^{19} , die einen Ringstromeffekt auf die δ -Methylgruppen zulässt und somit für die große Abschirmung sorgt. Die entstehende Kluft zwischen der α -Helix und dem β -hairpin wird durch die Verschiebung von L^{19} in den hydrophoben Kern kompensiert, was zur thermodynamischen Stabilität des Zinkfingers beiträgt. Dieses Erkenntnis ist nicht verwunderlich, da bei manchen Zinkfingerproteinfamilien der Austausch des zentralen Phenylalanins durch Leucin zwar zu einer Erniedrigung der Stabilität führt, andere Zinkfinger jedoch stabile Faltungen mit einem hydrophoben Kern ausschließlich basierend auf Leucinen bilden können. [39,156]

Die Ergebnisse von $\text{Xm}\delta^{13}$ und $\text{Xa}\delta^{13}$ wirkten vielversprechend in Hinblick auf die beobachtete selektive Verbreiterung der ϵ -Protonen. Die zusätzliche Ausdehnung der Substituenten könnte die Rotationsbarriere weiter anheben, sodass ein komplettes Ausfrieren der Beweglichkeit beobachtet werden könnte. Die Ergebnisse von $\text{Xe}\delta$ nach dem Einbau (ZFV-17) stehen in starker Analogie zu $\text{Xa}\delta^{13}$, da der sterische Anspruch der Substituenten ähnlich ist. Allerdings zeigt die Verbindung eine signifikant

schlechtere thermodynamische Stabilität, was durch den Signalverlust bei 310 K demonstriert werden konnte. Die weitere Ausdehnung des Volumens der Seitenkettenmodifikationen scheint mit ZFV-18 ($\text{Xi}\delta^{13}$) ihre Grenze hinsichtlich der Faltungsstabilität erreicht zu haben. Zwar zeigt das ^1H -NMR-Spektrum (Abbildung 94) unter den Faltungsbedingungen ein Signalmuster mit Hinweisen auf die $\beta\beta$ -Tertiärstruktur, jedoch verhinderte die unzureichende spektroskopische Qualität der TOCSY- und NOESY-Spektren eine vollständige Zuordnung dieses Derivats, da für ca. die Hälfte der Aminosäuren die entsprechenden Kreuzsignale fehlten. Daher konnte kein Strukturvorschlag, ausgehend von NOE-*restraints* erstellt werden. Selbst die Identifikation des $\text{Xi}\delta^{13}\zeta$ -Protons anhand der Multiplizität konnte nur mit einer geringen Genauigkeit erzielt werden und wurde auf 6.88 ppm festgelegt.

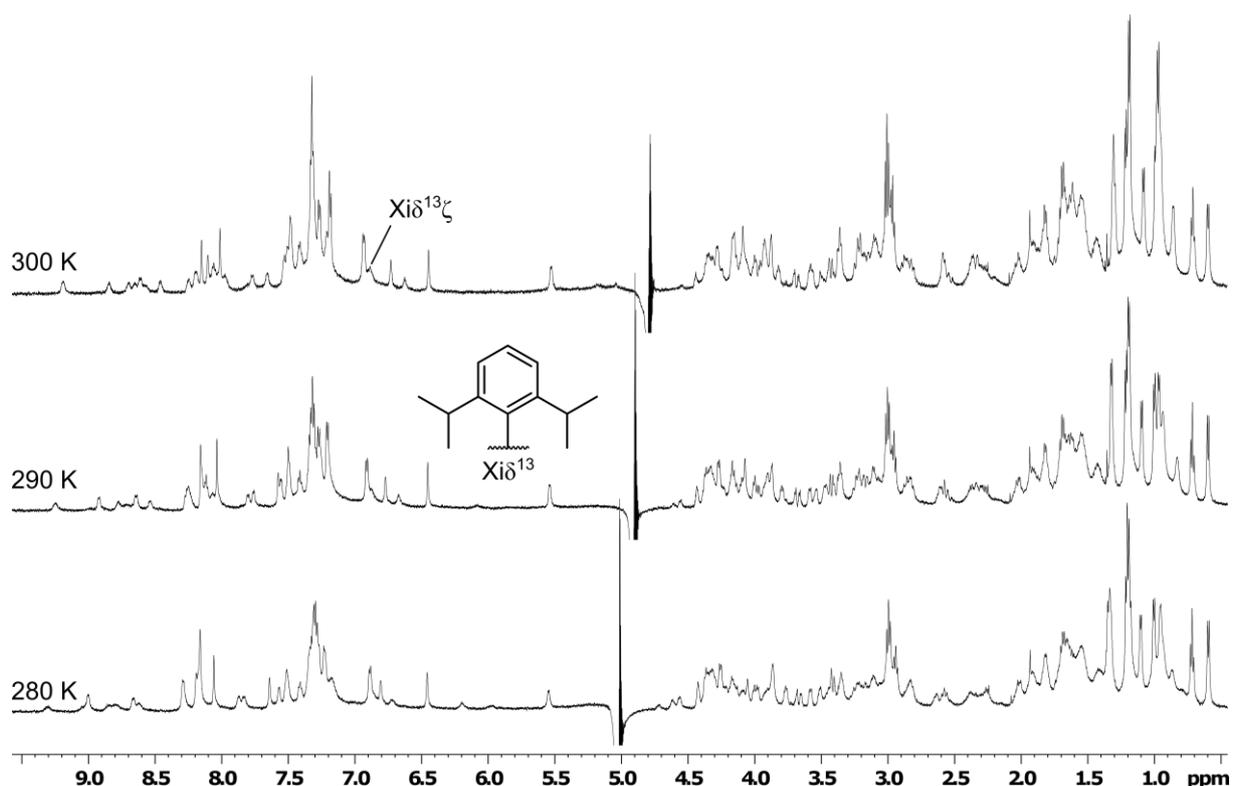


Abbildung 94: Charakterisierung der Faltungsstabilität von ZFV-18. Durch Aufnahme einer Temperaturreihe kann die begrenzte Stabilität von ZFV-18 aufgezeigt werden. Zwar indiziert das Signalmuster eine Faltung zum Zinkfingerstrukturmotiv, die jedoch durch den sterischen Anspruch der Seitenkette von $\text{Xi}\delta^{13}$ eine verringerte thermodynamische Stabilität aufweist. Die Identifikation des ζ -Protons von $\text{Xi}\delta^{13}$ erfolgte über die Multiplizität und chemische Verschiebung, wobei aufgrund der geringen spektroskopischen Qualität eine gewisse Ungenauigkeit entsteht.

Die Ergebnisse des Einbaus von Phenylalaninderivaten mit symmetrisch modifizierter δ -Position in Zinkfingerpeptiden zur Charakterisierung ihrer Dynamik lassen folgende Schlussfolgerung zu: Während die asymmetrische Substitution durch Aufbrechen der Symmetrie zu einer Vielzahl an neue NOE-Kontakte führte, wodurch nahezu jedes Derivat zusätzliche Informationen zur Rotationsmobilität lieferte, benötigen die doppelt symmetrisch substituierten Derivate weitere Untersuchungen. Zwar konnte die Rotationsbarriere erfolgreich angehoben werden, jedoch verhinderte der stark limitierte Temperaturbereich ein Ausfrieren der Rotation. Die vielversprechendsten Ergebnisse zeigten hierbei $\text{Xm}\delta$ (ZFV-15) und $\text{Xa}\delta$ (ZFV-16), da nach deren Mutation für Position 13 der Zinkfingersequenz eine

stabile Faltung erhalten, dennoch selektive Verbreiterungseffekte der jeweiligen Seitenkette beobachtet wurde. In Anlehnung an Abbildung 88 befinden sich beide Derivate in dem Bereich der langsamen Rotation, wodurch sowohl die Signale der Substituenten (Methyl und Methoxy) als auch der ϵ -Protonen so stark verbreitern, dass eine Detektion durch NMR-Spektroskopie nur unvollständig erfolgte. Die Aufnahme von NOESY-Spektren bei 280 und 290 K von ZFV-16 enthüllte, dass die Verbreiterung der vermeintlichen Kreuzsignale mit steigender Temperatur zunimmt. Diese Beobachtung bekräftigt die Annahme, dass es sich bei diesen Signalen um die ϵ -Protonen von $Xa\delta^{13}$ handelt. Außerdem enthielt nur ZFV-16 NOE-Kontakte in ausreichender Anzahl und Qualität, die es erlaubten, ein NMR-Strukturensemble zu erstellen. Dieser Strukturvorschlag demonstrierte hierbei den Grund für die starke Abschirmung der $L^{19}\delta$ -Signale, die Neuordnung des hydrophoben Kerns mit Leucin als zentraler Bestandteil, abgeschirmt durch den Ringstromeffekt von $Xa\delta^{13}$. Da die Beschaffenheit der Umgebung des hydrophoben Kerns nur eine bestimmte Ausdehnung der Substituenten an X^{13} erlaubt, führte die Mutation F13Xi δ zu keiner stabilen Faltung. Neben dieser Instabilität, belegt durch Temperaturreihen, konnte nur für die Hälfte der Aminosäuren aufgrund fehlender TOCSY-Kreuzsignale eine Zuordnung getroffen werden. Weiterhin konnte das ζ -Proton von Xi δ^{13} nur schwer detektierbar werden. Ein möglicher Grund für die verringerte thermodynamische Stabilität kann auch die langsame Rotation des modifizierten Phenylrings um χ_2 sein, die durch ihre voluminösen Substituenten zu markanten strukturellen Verzerrungen der Tertiärstruktur führt. Die Möglichkeit mit symmetrischen Modifikationen des Phenylrings nicht nur die Rotationsbarriere um χ_2 durch Ausdehnung des sterischen Anspruchs präzise anpassen zu können, sondern zusätzliche Informationen über die Zusammensetzung des hydrophoben Kerns, sowie über die Bedeutung der Rotation für Proteinstabilität zu gewinnen, hebt das Potential dieser Verbindungsklasse hervor. Zwar sind eine Vielzahl an weiteren möglichen Substituenten denkbar, die die Rotation so stark einschränken könnten, dass ein Ausfrieren durch Temperaturniedrigung sichtbar wäre, der begrenzte Temperaturbereich von Cys₂His₂-Zinkfingern verhindert jedoch die erfolgreiche Applikation dieser Methode. Die Limitation des verfügbaren Temperaturbereichs ergibt sich aus der Lösungsmittelzusammensetzung, die benötigt wird, um die Deprotonierung der Thiole einzuleiten und damit die Tertiärstruktur auszubilden. HORNE *et al.* stabilisierten die Sekundärstrukturelemente durch den sequenziellen Aufbau mehrere Disulfidbrücken, wodurch eine pH-unabhängige Faltung realisiert werden konnte.^[39] Diesem Peptid könnte ein größerer Temperaturbereich zur Verfügung stehen, wodurch ein Ausfrieren der Dynamik des hydrophoben Kerns ermöglicht werden könnte.

3.3 Korrelierte Dynamik von β,β -Diaryl- α -Aminosäurehybriden

3.3.1 Einleitung

Die Charakterisierung der Dynamik von Disulfidreichen dimeren Peptidepitopen (s Kapitel 3.1) sowie die gezielte Aufklärung der intrinsischen Beweglichkeit innerhalb des hydrophoben Kerns von Zinkfingermodellpeptiden, stellen zwei Beispiele für das Potenzial der Kombination aus experimentellen Methoden (organische Synthese und NMR-Spektroskopie) und atomaren Moleküldynamik-Simulationen dar. Obwohl beide untersuchten Systeme signifikante Unterschiede aufweisen, enthalten sie viele Gemeinsamkeiten. Als Beispiel ist die Ausbildung eines hydrophoben Kerns, bestehend aus aromatischen Aminosäuren zu nennen, der eine stabilisierende Wirkung durch den hydrophoben Effekt ausübt. Während das von SCHRIMPF *et al.*^[275] entwickelte Scharnier-Peptid zwei Tryptophane enthält, besteht ein isolierter Zinkfinger des Yin Yang1-Proteins aus bis zu vier Phenylalaninen. Neben diesen proteinogenen Aminosäuren lassen sich in einer Vielzahl von Peptidhormonen und weiteren Naturstoffklassen unnatürliche Aminosäurederivate finden.^[463-466] Die Darstellung dieser, teils medizinisch äußerst relevanten Peptide sowie die Verbesserung ihrer Aktivität durch zusätzliche Modifikationen, motivierte zahlreiche Arbeitsgruppen Methoden zu entwickeln, um neuartige Aminosäuren zu synthetisieren.^[467] Von besonderem Interesse ist hierbei die Verschmelzung zweier natürlicher Aminosäuren zu einem Aminosäurehybrid, deren Reaktivität sich nicht nur aus der Summe der Eigenschaften einzelner Bausteine beschreiben lässt, sondern durch interne, konkurrierende Bewegungen eine eigene Dynamik entwickeln kann. NICKE *et al.*^[95] entwarfen, aufbauend auf Vorarbeiten von YU *et al.*^[468] COREY *et al.*^[469] SHI *et al.*^[470] und CHEN *et al.*^[471] eine Synthesestrategie, um Phenylalanin und Tryptophan in einer einzigen Seitenkette miteinander zu vereinen. Die Nomenklatur dieser Hybride (Wsf, wsf, Wrf, wrf) ermöglicht nicht nur die Identifikation der verwendeten Seitenketten, sondern die direkte Zuordnung der entsprechenden Stereokonfiguration (Abbildung 95).

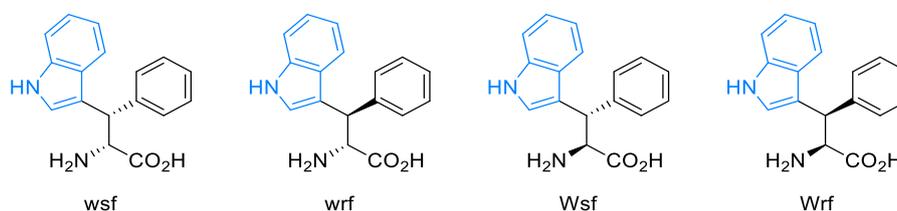


Abbildung 95: Nomenklatur der vier möglichen Aminosäurehybride, die aus der Verschmelzung von Tryptophan und Phenylalanin generiert werden können. Der Korpus, der nach CAHN-INGOLD-PRELOG-Konvention^[472] die höchste Seitenkettenpriorität besitzt, bestimmt den ersten Teil des Dreibuchstaben-Codes, wobei die L-Aminosäure mit der großen Variante und die D-Aminosäure mit der kleinen Variante des Buchstabens abgekürzt wird. Der zweite Buchstabe wird durch entsprechende Stereokonfiguration an β -Position mit *s* oder *r* definiert. Abgeschlossen wird dieser Dreibuchstabencode durch die Seitenketten der Aminosäure mit der geringeren Priorität.^[473]

Durch Optimierungen der orthogonalen Schutzgruppenstrategie, sowie milder Bedingungen zur Freisetzung der dirigierenden Gruppe, gelang es NICKE *et al.*, diese neuartigen Aminosäurehybride in ausreichenden Mengen für die Festphasenpeptidsynthese darzustellen.^[95] Die Verknüpfung beider

Seitenketten bringt diese in einen engen Kontakt, wodurch Ausrichtung und Dynamik der einzelnen aromatischen Ringe beeinflusst werden können. Diese Einschränkungen könnten so weitreichend sein, dass eine nahezu feste Konformation erhalten wird, die Auswirkungen auf die Aktivität in unterschiedlichen biologischen Systemen hätte. Es ist weiterhin denkbar, dass die Rotation einer Seitenkette Einfluss auf die Dynamik des anderen Rings ausübt und diesen ebenfalls zum Drehen zwingt. In der Literatur wird dieser Effekt als *gearing* (dt. Zahnrad) bezeichnet und ist vorrangig in Triptycen-Systemen zu finden.^[474] Daher soll im Folgenden die Charakterisierung der Dynamik von Aminosäurehybriden bestehend aus Phenylalanin und Tryptophan erfolgen sowie die Frage eines möglichen *gearings* beantwortet werden. Experimentelle Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie von NICKE *et al.* enthüllten bereits eine bevorzugte Ausrichtung der Seitenketten, weshalb theoretische Methoden zur ergänzenden Charakterisierung herangezogen werden sollten.^[95]

3.3.2 Die Flexibilität von β,β -Diaryl- α -Aminosäurehybriden auf Bausteinebene

Um eine detaillierte Beschreibung der Dynamik von Aminosäurehybriden zu ermöglichen, bedarf es zunächst dem Wissen der Beweglichkeit der einzelnen natürlichen Bausteine. Da die Zusammensetzung des Peptidrückgrats einen signifikanten Einfluss auf die Dynamik der Seitenkette ausüben kann, sollte die Betrachtung an möglichst identischen und kleinen Systemen erfolgen.^[475] Um dennoch die peptidische Umgebung möglichst genau nachzuahmen, wurde der N-Terminus acetyliert und der C-Terminus mit Methylamin amidiert. Das resultierende Dipeptid diente in zahlreichen Studien als Modellsystem für die Berechnung verschiedener physikochemischer Eigenschaften durch Moleküldynamik-Simulationen^[476-478] oder quantenmechanischen Berechnungen.^[479] Da Wsf aus der Kombination von Tryptophan und Phenylalanin besteht, sollte demnach, um eine gezielte Charakterisierung der Dynamikunterschiede zu ermöglichen, die entsprechenden drei Systeme getrennt in einer MD-Simulation betrachtet werden. Um die Ergebnisse auch auf peptidische Umgebungen übertragen zu können, wurden die einzelnen Aminosäurederivate mit einer Box aus Wasser umgeben. Bevor eine Simulation durchgeführt werden kann, muss zunächst die Frage des geeigneten Kraftfelds beantwortet werden. Da nur einzelne Bausteine betrachtet werden, treten die Unterschiede zwischen den Kraftfeldfamilien vermehrt in den Hintergrund. Bedeutender ist die Frage der Parametrisierung. Jedes der in Kapitel 1.6.2 erwähnten Kraftfelder besitzt für proteinogene Aminosäuren einen Parametersatz sowie die Anleitung zum Aufbau des Moleküls, die Topologie. Zwar sind mittlerweile auch einige unnatürliche Derivate, wie post-translationale Modifikationen in den Standard-Parametersatz integriert, generell werden jedoch für neuartige Aminosäuren entsprechende Parameter benötigt. In der Literatur finden unterschiedlichste Strategien, abhängig vom eingesetzten Kraftfeld ihre Anwendung.^[333,346,348] Ein simpler, dennoch häufig angewandter Ansatz ist die Zusammensetzung aus Fragmenten, samt ihrer jeweiligen Parameter.^[480] Dieser Fragment-basierte Ansatz erschien ideal für die Generierung eines Parametersatzes für Wsf und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit angewendet.

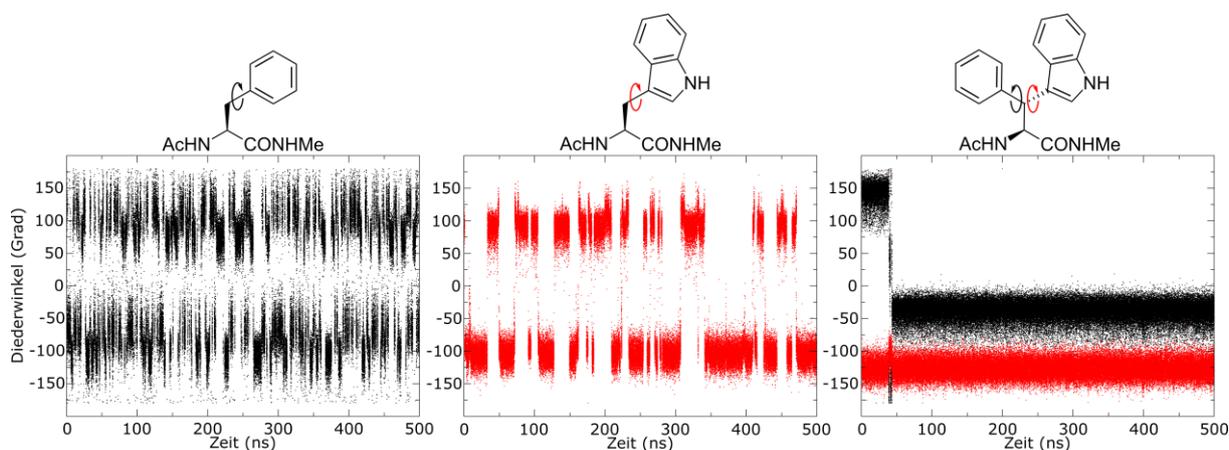


Abbildung 96: Entwicklung des χ_2 -Diederwinkels für Ac-Phe-NMe (links), Ac-Trp-NMe (mittig) und Ac-Wsf-NMe (rechts). Die Seitenkette des Phenylalanindipeptids ist in der Lage, hochfrequente Rotationen durchzuführen, um unterschiedliche Orientierungen zu erkunden. Dieses Verhalten ist auf das Tryptophanderivat übertragbar, jedoch konnte eine signifikant geringe Anzahl an Übergängen beobachtet werden. Die Kombination beider Seitenketten in Wsf verhinderte, nach einer kurzen Equilibrierungsphase mit einer einzelnen Drehung des Phenylrings, jegliche Rotation während der MD-Simulation.

Anhand der Entwicklung des χ_2 -Diederwinkels während der klassischen Moleküldynamik-Simulation in Abbildung 96 können Schlussfolgerungen zur Beweglichkeit der einzelnen Seitenketten getroffen werden. Der 6π -Aromat im Phenylalanin scheint eine niedrige Energiebarriere zu besitzen, da eine Vielzahl an Übergängen beobachtet wurde. Die Expansion des aromatischen Systems auf ein 10π -Indol resultierte in einen größeren sterischen Anspruch, was Auswirkungen auf die Beweglichkeit der Seitenkette in Tryptophan ausübte, da diese zwar frei rotierte, die Häufigkeit dieser Übergänge jedoch drastisch reduziert wurde. Der Vergleich beider Dipeptide zeigt zudem, dass aufgrund der Rotationssymmetrie nur zwei Orientierungen eingenommen werden können, nämlich -100 und 100° . Die Verschmelzung beider Seitenketten zum Wsf-Aminosäurehybrid resultierte in einer signifikanten Einschränkung der Dynamik beider aromatischen Reste, da, bis auf eine Drehung des Phenyls während der Equilibrierungsphase, keinerlei Rotation für beide Seitenketten beobachtet wurden. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die Einführung eines weiteren aromatischen Systems die chemische Umgebung der Seitenkette erheblich verändert. Da MD-Simulation ungeeignet für die Charakterisierung von seltenen Ereignissen, hervorgerufen durch hohe Energiebarrieren ist, wurden *wt*-Metadynamiken, durchgeführt, wobei als kollektive Variable die χ_2 -Torsion beeinflusst wurde.^[380] Während dieser Simulation werden Energieminima, definiert durch die verschiedenen Konformation der Seitenketten, mit einem positiven Gaußpotenzial aufgefüllt, wodurch nach einiger Simulationszeit das System in der Lage ist, neue Regionen zu erkunden. Dies erlaubt es nicht nur, die konformationelle Landschaft des Aminosäurehybrids detailliert zu beschreiben, sondern zusätzlich kann ein Energieprofil des beeinflussten Parameters, der kollektiven Variable, direkt aus der Summe der abgelegten Gaußpotenziale gewonnen werden (Abbildung 97).

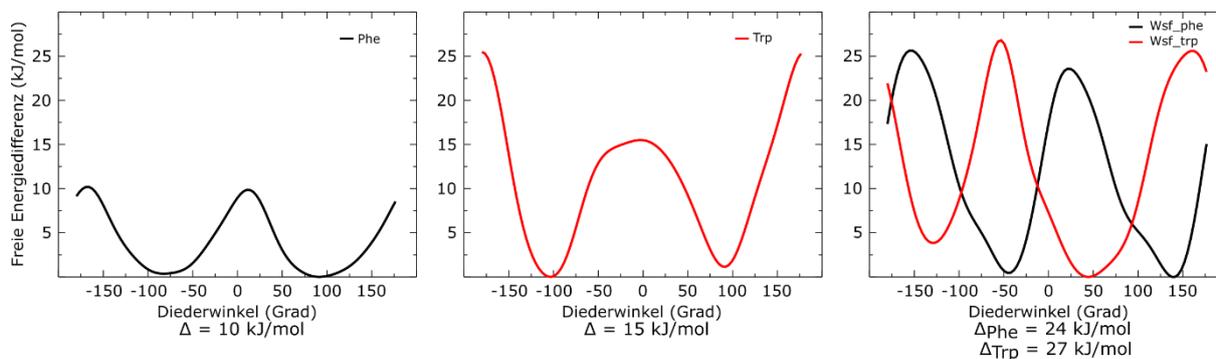


Abbildung 97: Das freie Energieprofil (χ_2) der Modellpeptide Ac-Phe-NMe (links), Ac-Trp-NMe (mittig) und Ac-Wsf-NMe (rechts), bestimmt durch eine *wt*-Metadynamik. Für eine Rotation um χ_2 benötigte der Phenylring nur 10 kJ/mol, was in Übereinstimmung mit den zahlreichen Übergängen, die in der klassischen MD-Simulation auftraten, steht. Eine Expansion des sterischen Anspruchs der Seitenkette im Tryptophanderivat führt zur Erhöhung der Energiebarriere auf 15 kJ/mol. Die Kombination beider Seitenketten in Wsf führte zu einer signifikant höheren Energiebarriere von 24-27 kJ/mol. Damit ein Energieprofil von beiden Seitenketten erhalten werden konnte, wurden zwei *wt*-Metadynamiken durchgeführt, wobei einmal χ_2^{ph} und einmal χ_2^{ind} beeinflusst wurde.

Anhand der *wt*-Metadynamik (Abbildung 97) der Dipeptide konnte gezeigt werden, dass die Phenylgruppe eine Energiebarriere von 10 kJ/mol überwinden muss, um eine Rotation durchzuführen, wobei der Diederwinkel vom Minimum bei 90 bis 100° zu -90 bis -100° sich verändert. Dieses Ergebnis steht in Vereinbarung mit den hochfrequenten Übergängen der Torsion während der MD-Simulation. Die Expansion der Seitenkette zum entsprechenden Indol, hatte keine Auswirkung auf die Lokation der korrespondierenden Minima, während die Barriere der Rotationsenergie auf 15 kJ/mol angehoben wurde. Des Weiteren ist durch die Asymmetrie der Indolgruppe nun eine bevorzugte Rotationsrichtung vorgegeben, was ein asymmetrisches Energieprofil zur Folge hat. Der Unterschied zwischen den Minima kann mit 1 kJ/mol jedoch vernachlässigt werden. Die Verschmelzung der beiden Seitenketten im Aminosäurehybrid Wsf, indiziert das Ausmaß der Konformationsrestriktion, da ein Anstieg der Energiebarriere auf 24 kJ/mol beobachtet wurde. Weiterhin wurde durch die unterschiedliche chemische Umgebung innerhalb der Seitenkette das Energieprofil verschoben, sodass zwar weiterhin ein symmetrischer Verlauf erhalten wurde, dessen Minima jedoch bei -45 und 145° lokalisiert sind. Um die freie Energiefläche der Rotation des Indols in Wsf zu erhalten, wurde eine weitere *wt*-Metadynamik durchgeführt, währenddessen dieser Diederwinkel beeinflusst wurde. Erneut konnte eine Erhöhung der Barriere auf 27 kJ/mol beobachtet werden. In Kontrast zum Energieprofil des Phenyls in Wsf, sind die Minima des Indols nicht um 50°, sondern um -50° verschoben, was auf die unterschiedliche Ausrichtung der Seitenketten zurückzuführen ist. Zudem konnte eine Energiedifferenz der Minima im Indol von 5 kJ/mol verzeichnet werden. Analysen der Höhe des Gaußpotenzials zeigten, dass bereits nach einer kurzen Simulationszeit von 100 ns das Potenzial rapide abfällt. In Übereinstimmung dazu, konnte nur eine unbedeutende Änderung der freien Energiefläche in den letzten 250 ns vermerkt werden, was in Kombination mit dem abfallenden Gaußpotenzial eine erfolgreiche Konvergenz der *wt*-Metadynamik kennzeichnete.

Die Charakterisierung der individuellen Beweglichkeit erlaubt es nun, die Betrachtung der Dynamik der Seitenketten zueinander durchzuführen. In Analogie zum *gearing*-Effekt sollte untersucht werden, ob die geometrische Zusammensetzung im Wsf eine abhängige Rotation erzwingt, oder der Zahnradschlupf, also das eigenständige Rotieren der Seitenketten unabhängig voneinander, die dominierende Bewegung darstellt. Abbildung 98 vergleicht hierbei die χ_2 -Torsion aus beiden *wt*-Metadynamiken miteinander.

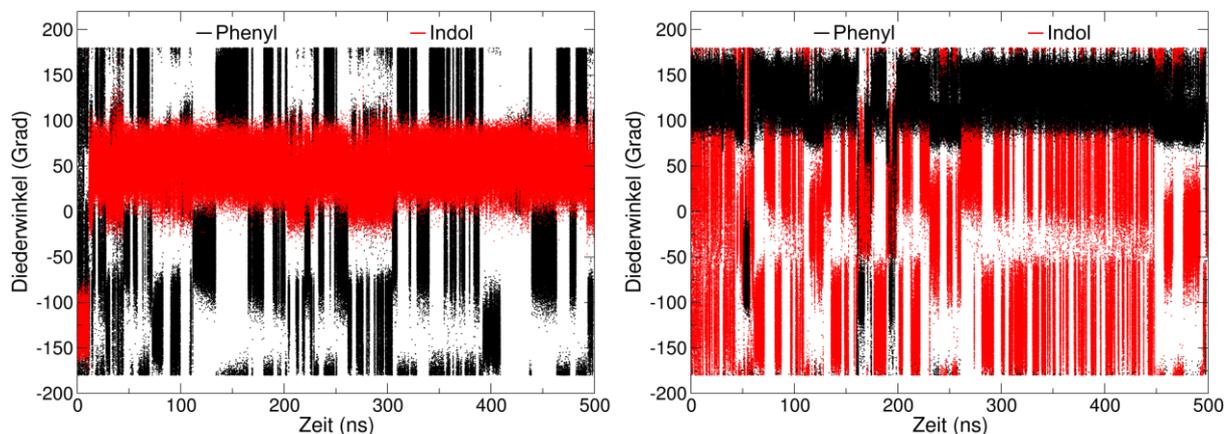


Abbildung 98: Evaluation des *gearing*-Effekts der Seitenketten von Ac-Wsf-NMe während einer *wt*-Metadynamik. Die Beeinflussung des χ_2^{ph} -Diederwinkels führt zu hochfrequenten Wechseln der Torsion während der Simulation (links). Bis auf einer einzigen Änderung der χ_2^{ind} -Torsion von -125° auf 50° nach kurze Equilibrierung, konnte kein Wechsel des Indols beobachtet werden. In einer zweiten *wt*-Metadynamik wurde der χ_2^{ph} -Diederwinkel manipuliert, wodurch erneut die Anzahl der Übergänge drastisch gesteigert wurde (rechts). Da die Indol-Gruppe einen größeren sterischen Anspruch besitzt, könnte bei ihrer gezielten Drehung die Phenylgruppe ebenfalls zur Rotation gezwungen werden. Zwar wurden einzelne Torsionsänderungen von χ_2^{ph} beobachtet, die jedoch zu unregelmäßig auftraten, als dass von *gearing* gesprochen werden kann.

Obwohl die beiden aromatischen Ringsysteme in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander angeordnet sind, können diese dennoch unabhängig voneinander rotieren. In beiden *wt*-Metadynamik-Simulationen (Manipulation von χ_2^{ph} oder χ_2^{ind}) wurde die Anzahl an Rotationen um den jeweiligen χ_2 -Diederwinkel drastisch gesteigert, jedoch konnte nur vereinzelt korrelierte Bewegungen beobachtet werden, was auf eine geringe Ausprägung der molekularen Verzahnung schließen lässt. Somit gilt der Zahnradschlupf als dominierende Bewegungsform. Dennoch bietet das Konzept von β,β -Diarylaminosäurehybride einen idealen Startpunkt für weitere Untersuchungen hinsichtlich korrelierter Dynamiken.

3.3.3 Theoretische Untersuchungen zu denkbaren Diarylaminosäurehybriden mit *gearing*-Effekt

Im vorherigen Kapitel wurden β,β -Diarylaminosäurehybride, im Speziellen die Kombination aus Phenylalanin und Tryptophan auf ihre korrelierten Bewegungen innerhalb der Seitenkette untersucht, wobei zwar eine Restriktion der Dynamik festgestellt werden konnte, jedoch kein *gearing*-Effekt nachweisbar war. In Zusammenarbeit mit Valeska Viereck wurde ein Konzept entwickelt, um mit Hilfe von quantenmechanischen Berechnungen potenzielle β,β -Diarylaminosäurederivate zu identifizieren, die einen möglichen *gearing*-Effekt zeigen könnten. Um den Einfluss unterschiedlicher

Parametrisierungsstrategien der verschiedenen Kraftfelder zu minimieren, sollten *ab initio* Methoden verwendet werden. Für die quantenchemische Betrachtung kleinerer Systeme konnten sich Dichtefunktionaltheorie-Berechnungen innerhalb der wissenschaftlichen Community etablieren und werden zunehmend als supplementierende Methode für Untersuchungen von physikochemischen Eigenschaften unterschiedlichster Verbindungen eingesetzt.^[481] Eine der am häufigsten verwendeten Methoden ist hierbei B3LYP,^[482] die sich aus einem HATREE-FOCK-Anteil und empirischen Parametern zusammensetzt.^[483] Die Fokussierung auf quantenmechanische Berechnungsmethoden erlaubte es, eine Vielzahl an verschiedenen Aminosäurederivate *in silico* herzustellen und auf die Beweglichkeit der χ_2 -Torsion zu untersuchen, ohne die entsprechende Parametrisierung für ein etabliertes Kraftfeld durchführen zu müssen. Die Analyse des Energieprofils des χ_2 -Diederwinkels sollte über die *relaxed-scan*-Methode erfolgen, bei der die Torsion ausgehend von einer optimierten Startstruktur wenige Grad verändert und anschließend erneut einer Energieminimierung unterzogen wird. Neben der Berechnungsmethode (B3LYP) muss zunächst ein Basissatz, der aus einer bestimmten Anzahl an mathematischen Funktionen, die das untersuchte System beschreiben, ausgewählt werden. Hierfür eignen sich erneut *benchmarks* mit einfachen Verbindungen, da diese die Rechenzeit verkürzen und gleichzeitig Aussagen über die Passgenauigkeit der Methode getroffen werden können. Da Wsf aus Phenylalanin und Tryptophan zusammengesetzt ist, bieten sich beide Aminosäuren individuell betrachtet als ideales Testsystem an. Da die Vielzahl an Freiheitsgraden einen enormen Einfluss auf das Ergebnis der quantenmechanischen Optimierung ausübt, wurden mit Hilfe des Programms *balloon* 20 Konformere generiert und jedes anschließend minimiert.^[484] Ausgehend von der energieniedrigsten Anordnung wurde nun der relaxierende *scan* gestartet und die Ergebnisse für Phenylalanin und Tryptophan in Abbildung 99 zusammengefasst.

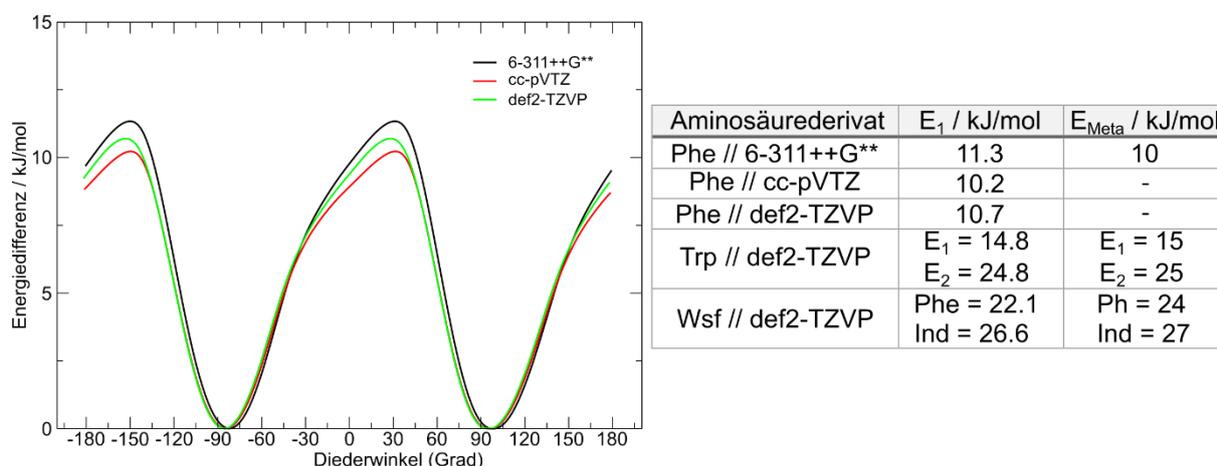


Abbildung 99: Energieprofil des χ_2 -Diederwinkels von Ac-Phe-NMe, bestimmt durch quantenchemische Methoden. Die entsprechenden Energiewerte für diese Verbindung und weitere Derivate sind in der Tabelle rechts angegeben.

Die Unterschiede der Energieprofile (Abbildung 99) sind minimal und beschränken sich auf die Höhe der entsprechenden Barrieren. Durch die Kombination dieser marginalen Differenzen mit den Auswirkungen auf die Berechnungszeit, ließ sich der def2-TZVP-Basissatz^[485] als idealer Kompromiss

aus Genauigkeit und Praktikabilität identifizieren. Sämtliche Energiewerte in diesem Kapitel beziehen sich auf Berechnungen mit diesem Basissatz und der B3LYP-Methode. Die quantenmechanisch bestimmte Energiebarriere der χ^2 -Torsion in Phenylalanin von 10.7 kJ/mol zeigt zudem eine geringe Abweichung zu den Ergebnissen der *wt*-Metadynamik, was die Erkenntnisse aus dem vorherigen Kapitel zusätzlich bestärkt. Dieser Sachverhalt kann auf den Vergleich der Energiebarrieren von Tryptophan übertragen werden. Da die Rotation des Indols asymmetrisch verläuft, entstehen zwei Maxima mit 14.8 und 24.8 kJ/mol, die erneut den Werten der *wt*-Metadynamik entsprechen. Dieses Ergebnis lässt sich durch die Parametrisierungsstrategie des CHARMM36-Kraftfelds erklären, dessen Energieprofile für Diederwinkel anhand quantenmechanischer Berechnungen optimiert wurden.^[346] Für die *wt*-Metadynamiken von Wsf wurden die Parametersätze von Phenylalanin und Tryptophan kombiniert und um fehlende Terme ersetzt, die von simpleren Molekülen abgeleitet wurden. Zwar ermöglicht dieser Ansatz die rapide Generierung von neuen Parametersätzen, jedoch könnte die fehlende Optimierung der Variablen zu ungenauen Energieprofilen führen. Während die *wt*-Metadynamik die Barrieren für $\chi^{2\text{ph}}$ mit 24 kJ/mol und $\chi^{2\text{ind}}$ mit 27 kJ/mol abschätzte, konnte durch quantenmechanische Berechnungen ein Wert von 22.1 beziehungsweise 26.6 kJ/mol erhalten werden. Diese gute Übereinstimmung demonstriert, dass die Parametrisierung neuartiger Aminosäuren, durch die Kombination entsprechender Fragmente, zu aussagekräftigen Parametersätzen führen kann.

Abbildung 98 aus Kapitel 3.3.2 zeigte, dass die Seitenketten von Wsf keinen, oder nur einen geringen *gearing*-Effekt besitzen. Als mögliche Begründung kann die Flexibilität von Indol und Phenyl angesehen werden, da diese durch ihren geringen sterischen Anspruch in der Lage sind, einer rotierenden Gruppe auszuweichen, ohne ihren eigenen Diederwinkel stark anpassen zu müssen. Diese Bewegungsform wird als Zahnradschlupf bezeichnet.^[364] Die Ausdehnung eines, oder mehrerer Fragmente dieses Zahnrads könnte das Ausweichen verhindern und ein *gearing* ermöglichen. Folgt man diesem Gedankengang, so müsste die Substitution einer der aromatischen Seitenketten, zur Erhöhung der Energiebarriere führen. Es ist jedoch Vorsicht geboten, da eine zu intensive Ausdehnung die Rotation um χ^2 so stark einschränken könnte, dass beide Seitenketten eine rigide Konformation einnehmen. Daher wurden zunächst kleine Modifikationen evaluiert, die zusätzlich im Rahmen von synthetischen Methoden darstellbar wären. Neben Substitutionen des Phenylrings, wurden zudem aliphatische Substitutionen am Indol ebenfalls untersucht. Abbildung 100 fasst die modellierten Wsf-Derivate, samt der Energiebarriere ihrer markierten χ^2 -Rotation zusammen.

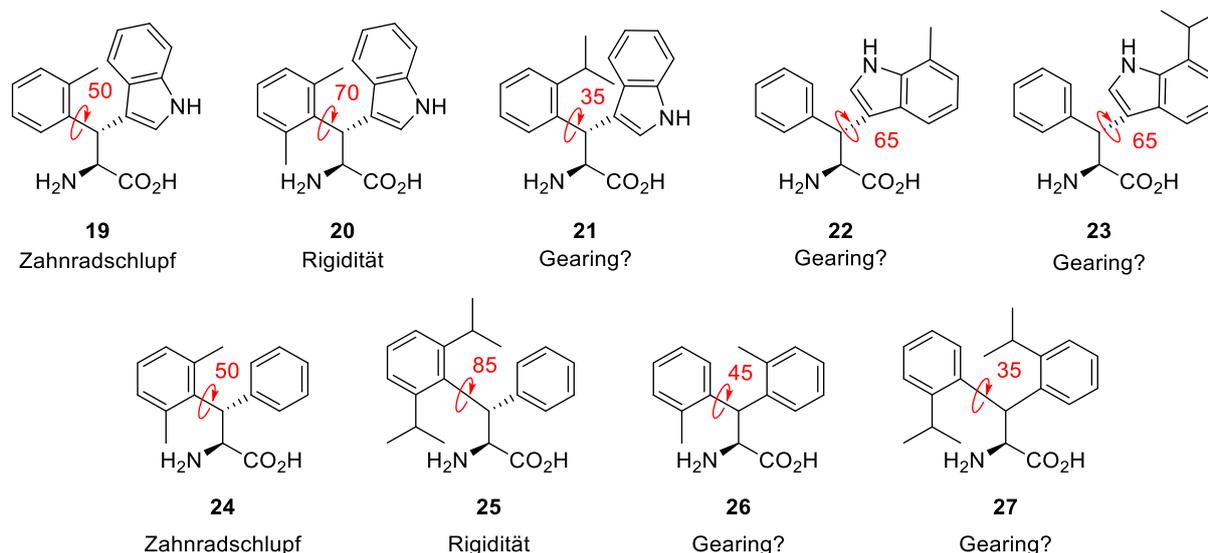


Abbildung 100: Mögliche Aminosäurehybridderivate, die im Rahmen quantenmechanischer Untersuchungen von VALESKA VIERECKT unter Aufsicht von PHILIP HORX identifiziert wurden. Neben aliphatischen Modifikationen der Phenyl- und Indol-Seitenkette im Wsf wurden auch β,β -Diarylaminosäuren auf Basis von Diphenylalanin evaluiert. Als Kriterium für ein mögliches *gearing* gilt neben der Energiebarriere, noch die geometrische Anordnung der Seitenketten zueinander.

Die Zusammenfassung der Aminosäurehybridderivate, die potenzielle *gearing*-Bewegungen ausführen können, demonstriert, dass selbst einfache Methylierungen einen signifikanten Einfluss auf die Energiebarriere der Rotation ausüben können. Im Fall von **19** führt die Methylgruppe an der δ -Position des Phenylrings zu einer Erhöhung auf 50 kJ/mol. Dieser Anstieg könnte ein Anzeichen für mögliche *gearing*-Effekte sein, jedoch ist der Abstand beider aromatischer Systeme zueinander zu groß, sodass eine Rotation des Phenyls nicht automatisch eine komplette Rotation des Indols erzwingt. Als möglicher Mechanismus konnte der Zahnrad-schlupf identifiziert werden.^[364] Hierbei erfolgt während der Rotation des Phenyls nur eine marginale Änderung der Torsion des Indols, wodurch ein Vorbeidrehen ermöglicht wird. Durch die Ausdehnung des Substituenten in Verbindung **21** könnte der Zahnrad-schlupfmechanismus unterdrückt und stattdessen korrelierte Bewegungen durch die Erhöhung der Verzahnung ermöglicht werden. Interessanterweise ergaben die quantenmechanischen Berechnungen, dass die Einführung eines *Isopropyls* die Energiebarriere um 15 kJ/mol im Vergleich zur Methylgruppe senkt. **21** stellt damit einen möglichen Kandidaten für molekulares *gearing* dar. Ein weiterer Ansatz, um die molekulare Verzahnung der Seitenketten zu erhöhen, ist die doppelte, symmetrische Modifikation eines aromatischen Rests (**20**), wobei hierbei eine solch große Energiebarriere für χ_2 erhalten wurde, dass bei Raumtemperatur wahrscheinlich keine Rotation mehr möglich ist. Auch Substitutionen am Indol sind synthetisch zugänglich^[486] und könnten die Barriere in Richtung molekulares *gearing* verschieben. Neben der Betrachtung von Wsf-Derivaten, wurden auch β,β -Diarylaminosäurehybride auf Basis des Diphenylalanins untersucht. Durch den verringerten sterischen Anspruch der zweiten Phenylgruppe im Vergleich zum Indol ist der Einfluss der symmetrischen Methylierung geringer ausgeprägt, was sich in einer Barriere von 50 kJ/mol im Vergleich zu 70 kJ/mol niederschlägt. Trotz der hohen Barriere weist **24** nur eine unzureichende

molekulare Verzahnung auf, wodurch der Zahnradschlupf als dominierende Bewegungsform erwartet wird. Erneut führte die Expansion Substituenten zu starren Seitenketten, die wahrscheinlich nicht in der Lage sind Rotationen durchzuführen. Die von NICKE *et al.*^[95] entwickelte Synthesestrategie zur Generierung von β -verzweigten Diarylaminosäuren enthält das Potenzial, durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur direkt zwei modifizierte Aryl-Iodide in einem Schritt miteinander zu verknüpfen. Hierdurch sind Aminosäurehybride denkbar, die symmetrisch an beiden aromatischen Resten modifiziert wurden. Überraschenderweise zeigten sowohl **26** als auch **27** Energiebarrieren, die für eine Zahnradbewegung sprechen könnten, wobei die Einführung von Isopropyl die Barriere im Vergleich zum Methyl erneut verringert. Zusammenfassend kann folgende Aussage getroffen werden: Durch die synthetische Etablierung von β,β -Diarylaminosäurehybriden von NICKE *et al.* wurde das Grundgerüst für potenzielle *gearing*-Effekte innerhalb der Seitenketten gelegt.^[95] Die unzureichende molekulare Verzahnung erlaubte jedoch den Zahnradschlupf als dominierende Bewegungsform. Mit Hilfe von quantenmechanischen Berechnungen, die von VALESKA VIERECKT unter der Aufsicht von PHILIP HORX durchgeführt wurden, konnten synthetisch zugängliche Derivate identifiziert werden, die neben der geeigneten Energiebarriere noch eine passende molekulare Verzahnung besitzen. Zukünftige Untersuchungen sollten sich daher auf die Synthese dieser vielversprechenden Kandidaten fokussieren. Um eine entsprechende *gearing*-Bewegung anschließend hervorzuheben, könnten Parametrisierungen für verschiedene Kraftfelder durchgeführt werden, um MD-Simulation beziehungsweise *wt*-Metadynamiken zu ermöglichen.

3.3.4 Dynamisches Verhalten von β,β -Diarylaminosäurehybriden innerhalb eines Hexapeptids

Durch die Verwendung von β,β -Diarylaminosäurehybriden können Seitenketten in einer definierten konformationellen Anordnung fixiert werden, ohne dass eine Modifikation der funktionellen Gruppen, die eine elementare Rolle in der biologische Aktivität spielen, erforderlich ist. Diese Einschränkungen erhöhten oder verringerten, abhängig von der Konformation der Seitenkette des β -Arylierten-Tryptophanderivats, die Rezeptoraktivität für kurze Ghrelin-Peptid-Analoga.^[16] Als möglicher Grund konnte die Passgenauigkeit der eingenommenen Peptidkonformation identifiziert werden. Da die Sequenz des Peptids auf sechs Komponenten reduziert wurde und die Verwendung von D-Aminosäuren eine gestreckte Struktur präferieren, sollten NMR-Strukturen des Derivats mit der höchsten Aktivität anhand von NOE-Kontakten mit der Programmsuite *Xplor-NIH*^[400] erstellt werden. Da das implizite *eefx2*-Kraftfeld^[402] eine Anpassung des CHARMM-Kraftfelds darstellt, konnten die Parameter von 3.3.2 übertragen werden. Zusätzlich zeigte die Gegenüberstellung der Energiebarrieren, die entweder durch quantenmechanische Berechnungen oder durch *wt*-Metadynamiken bestimmt wurden, dass die Parameter eine gute Aussagekraft über die Dynamik der Seitenketten besitzen. Die Auswertung der zweidimensionalen NOESY-Spektren enthüllte einen dominanten Ende-zu-Ende NOE-Kontakt zwischen $\omega\text{sf}^2\text{H}\alpha$ und dem terminalen primären Amid, was auf eine zyklische Struktur hindeutet.

Weiterhin konnte durch Messungen von ^1H -Spektren bei unterschiedlicher Temperatur ($\nu\text{T-NMR}$), das Leu^6NH als Proton mit der niedrigsten Exposition zum Lösungsmittel identifiziert werden, da nur eine geringe Temperaturabhängigkeit beobachtet wurde. Dies deutet darauf hin, dass dieses Amidproton in eine Wasserstoffbrückenbindung eingebunden ist. NMR-Struktur-Berechnungen auf Basis der NOE-Kontakte sowie der 3J -Kopplungen, offenbarte eine $\text{Leu}^6\text{NH} - \text{Lys}^1\text{CO}$ Wasserstoffbrückenbindung, die einen 16-gliedrigen Ring innerhalb einer π -Helix umfasst (Abbildung 101). Dies ist verwunderlich, da eine alleinstehende π -Helix in der Regel nur unzureichend stabilisiert ist, um ihr Strukturmotiv ausbilden zu können.^[14] Weiterhin erklärt dieser Strukturvorschlag die starke Abschirmung des $\text{Leu}^5\gamma\text{H}$, das hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Indol des benachbarten trp^4 eingeht. Somit bietet das kurze Ghrelin-Peptid ein ideales System für den Einbau von β,β -Diarylaminosäurehybriden, da diese nicht nur eine leichte stabilisierende Wirkung auf die π -Helix ausüben, sondern zusätzlich, abhängig von ihrer Stereokonfiguration, die Rolle des inversen Agonisten sogar zum Agonisten umkehren können.^[16] Die Identifikation einer isolierten π -Helix mit nur einer Windung, bestehend aus sechs Aminosäuren liefert wichtige Grundlagen für zukünftige Untersuchungen bezüglich der Stabilität dieses Strukturmotivs.

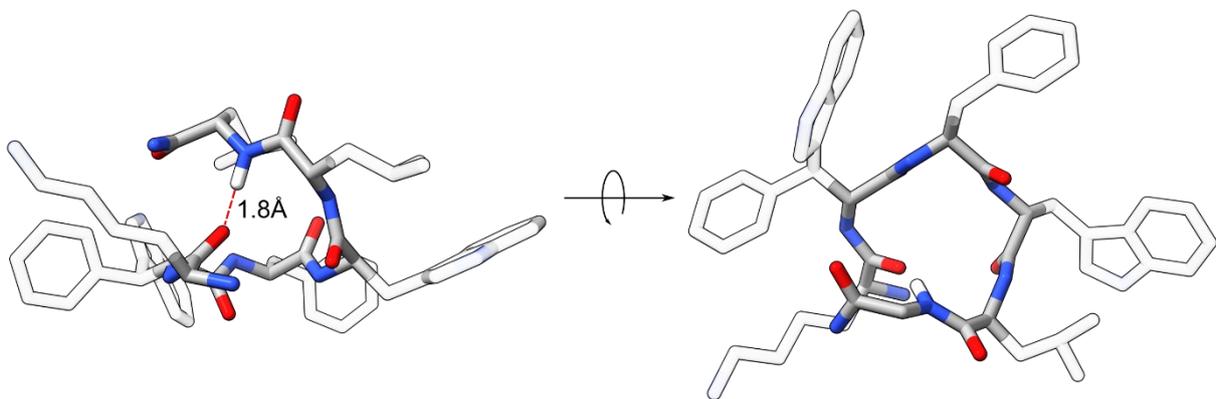


Abbildung 101: Strukturmodell des wsf^2 -Ghrelin-Hexapeptids, dessen Wasserstoffbrückenbindung zwischen Leu^6NH und Lys^1CO mit Hilfe von Temperaturreihen der ^1H -NMR-Spektren identifiziert wurde (links). NOE-Kontakte enthüllten zudem die Anordnung des Backbones in einer π -Helix, die einen 16-gliedrigen Ring umfasst (rechts). Weiterhin konnte die starke Abschirmung des $\text{Leu}^5\gamma$ -Protons durch hydrophobe Wechselwirkungen zum Indol des trp^4 hervorgehoben werden.

4. Zusammenfassung

Die Tertiärstruktur eines Proteins, die für dessen Funktion eine essenzielle Bedeutung einnimmt, ist permanenten strukturellen Fluktuationen ausgesetzt. Der Grund für diese Bewegungen ist vielfältiger Natur und häufiger Mittelpunkt von zahlreichen wissenschaftlichen Untersuchungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Bewegungen mit kleiner Amplitude und schneller Frequenz als auch langsame, gerichtete Strukturänderungen beschrieben. Dabei wurde jedes System nach dem gleichen Schema analysiert. Jedes bioorganische Molekül, das in dieser Arbeit untersucht wurde, zeigte eine nicht vollständig charakterisierte korrelierte Dynamik. Ausgehend von der initialen Beobachtung wurde für jedes System eine gezielte Fragestellung formuliert und anschließend das entsprechende Konzept, basierend auf synthetischen, analytischen oder theoretischen Methoden, entwickelt. Die so erhaltenen Ergebnisse beantworteten nicht nur die ursprüngliche Fragestellung, sondern lieferten wichtige Informationen für das gezielte Design von Miniproteinen. Dieses Schema soll nun an ausgewählten Beispielen dieser Arbeit erläutert werden. Die Chronologie der Auflistung folgt dabei explizit nicht der Gliederung des Kapitels "Ergebnisse und Diskussion", stattdessen erfolgt die Beschreibung anhand der Systematik aus Abbildung 102.

Zunächst wurde die Dynamik von synthetischen Aminosäuren, dem Wsf, einem β,β -Diaryl- α -Aminosäurehybrid sowie Hot=Tap, einem bizyklischen turn-Mimetikum charakterisiert. Ersteres kann als eine Kombination aus Phenylalanin und Tryptophan betrachtet werden, jedoch zeigten NMR-spektroskopischen Untersuchungen von NICKE *et al.*^[95] Hinweise auf eine abhängige Beweglichkeit der Seitenketten, das so genannte *gearing*. Um diese Hypothese auf ihre Richtigkeit zu überprüfen und die korrelierte Dynamik zu charakterisieren, wurde eine Kombination auf MD-Simulation und *wt*-Metadynamik angewandt. Es konnte gezeigt werden, dass die Energiebarrieren für die χ_2 -Rotation von 10 beziehungsweise 15 kJ/mol im Phenylalanin und Tryptophan auf 24 und 27 kJ/mol im Wsf angehoben wurden. Die geringe Verzahnung der Seitenketten verhinderte jedoch ein konsequentes *gearing*, wodurch der Zahnradschlupf als dominante Bewegungsform identifiziert wurde. Da das Grundgerüst von β,β -Diaryl-Aminosäuren ein ideales System für *gearing*-Dynamik darstellt, wurden mit Hilfe von quantenchemischen Berechnungen Derivate postuliert, die sowohl eine ideale Verzahnung und Energiebarriere aufweisen als auch synthetisch zugänglich sind. Um die Erkenntnisse auf ein biologisch relevantes Strukturmotiv zu übertragen, wurden NMR-Strukturen eines Ghrelin-Peptid-Analogons erstellt, wobei gezeigt werden konnte, dass die gezielte Ausrichtung der Wsf-Seitenkette zur Stabilisierung einer isolierten π -Helix mit nur sechs Aminosäuren führt. Die Ergebnisse, die aus der Charakterisierung der korrelierten Dynamik von β,β -Diaryl-Aminosäuren gewonnen wurden, liefern wichtige Grundlagen für das Design von Miniproteinen mit gezielter Seitenkettenausrichtung.

Der Einfluss des *turn*-Mimetikums Hot=Tap wurde bereits in verschiedenen peptidischen oder gar proteinartigen Umgebungen erfolgreich untersucht.^[33] Jedoch lag der Fokus häufig auf der direkten Stabilisierung der Struktur beziehungsweise die Veränderungen benachbarter Aminosäuren. Bisher war

es nicht möglich, einen etwaigen *long-range*-Effekt zu quantifizieren. Um dies zu ermöglichen, wurde der synthetische Baustein in ein weiteres Strukturmotiv eingebaut, dem dritten Zinkfinger des Yin Yang-1 Proteins, der eine $\beta\beta\alpha$ -Faltung ausbildet. Es konnte gezeigt werden, dass der Zinkfinger Hot=Tap im β -turn nicht nur toleriert, sondern eine Faltung mit erhöhter thermodynamischer Stabilität erhalten wurde. Durch eine Kombination von NMR-Spektroskopie und Dynamiksimulationen konnte erstmals der *long-range*-Effekt von Hot=Tap nachgewiesen werden. Die Rigidität des bizyklischen Systems schränkte die Flexibilität der benachbarten Seitenketten ein, was eine stärkere Abschirmung der β -Protonen des His²⁶ durch den Ringstromeffekt des Phe⁶ zur Folge hatte. Die Stabilisierung des β -hairpins hatte zudem einen direkten Einfluss auf die Dynamik des hydrophoben Kerns, genauer gesagt, die Rotation von Phe¹³ um χ_2 . Diese Beweglichkeit ist gleichzeitig Teil der nächsten Fragestellung. Die Tertiärstruktur des dritten Zinkfingers des Yin Yang-1 Proteins besteht neben einem β -hairpin und einer α -Helix auch noch aus einem kompakten hydrophoben Kern, der von den Sekundärstrukturelementen umschlossen ist. Im Rahmen der NMR-spektroskopischen Untersuchung konnte eine schnelle Rotation von Phe¹³ im hydrophoben Kern, um χ_2 beobachtet werden. Diese Beweglichkeit führte zur Ausbildung eines AA'BB'C-Spin-Systems. Eine genauere Charakterisierung dieser Rotation nach den etablierten Methoden von WÜTHRICH *et al.*^[287] war indes nicht möglich, da das Zinkfingerpeptid über einen stark limitierten Temperaturbereich verfügt. Daher wurde eine Strategie, aufbauend aus der Kombination von synthetischen Aminosäuren, NMR-Spektroskopie, MD-Simulationen und *wt*-Metadynamik konzipiert, die eine temperaturunabhängige Beschreibung der Dynamik ermöglichte. Um einen maximalen Informationsgewinn über die Orientierung des Phenylrings im hydrophoben Kern zu erlangen, sollte die Symmetrie der Rotation durch synthetische Modifikationen gebrochen werden. Hierfür wurden Derivate entwickelt, die den speziellen Anforderungen, systematische Variabilität, ähnliche Polarität, synthetische Zugänglichkeit und gute spektroskopische Eigenschaften, entsprechen. Es konnte gezeigt werden, dass Toly- beziehungsweise Xylyl-Derivate die ideale Funktionalität für die vorhandene Fragestellung bereitstellen. Als konkretes Beispiel soll hierbei Fm ϵ ¹³ genannt werden, dessen Methylierung in ϵ -Position nicht nur zu einem thermodynamisch äußerst stabilen Zinkfingerpeptid mit Ausrichtung der Methylgruppe außerhalb des Zinkfingerkerns führte, sondern die Rotation des Phenylrings um χ_2 nahezu vollständig stoppte. Die Position des Substituentens spielt eine entscheidende Rolle für die Beweglichkeit, da die Methylierung der δ -Position, Fm δ ¹³, zwar ebenfalls die Rotation verlangsamt, jedoch NMR-spektroskopisch die Ausrichtung ins Innere des Peptids mit einem Verhältnis von 70/30 nachgewiesen werden konnte. Neben der einfachen Modifikation wurden Derivate synthetisiert, die eine zweifache Methylierung des Phenylrings enthielten. Durch die unterschiedlichen Anordnungsmöglichkeiten (*syn* oder *anti*), konnte der Einfluss einer einzelnen Methylgruppe präzisiert werden. Hervorzuheben ist hierbei Fxp¹³ mit dem gegenüberliegenden Methylierungsmuster, dessen Rotation so stark verlangsamt war, dass eine selektive Verbreiterung der aromatischen Protonen bei Raumtemperatur im ¹H-NMR beobachtet wurde. Erneut wurden *wt*-Metadynamiken zur präzisen Charakterisierung der Energiebarrieren verwendet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass jedes

Substitutionsmuster eine unterschiedliche Barriere, abhängig von der Anordnung und Art der Substituenten zur Folge hatte. Erneut ist hierbei Fxp¹³ zu erwähnen, dessen Energiebarriere geringer ausfällt als das native Phenylalanin. Die Gegenüberstellung der Energieprofile ermöglichte zudem die Quantifizierung des *long-range*-Effekts von Hot=Tap, da der Einbau dieser Aminosäure die Energiebarriere der Phe¹³-Rotation im Vergleich zum nativen Zinkfinger nahezu verdoppelte. Sollte dennoch das Verlangen bestehen, die Analyse der Beweglichkeit durch Temperaturgradienten durchzuführen, müsste die Rotationsbarriere auf ein entsprechendes Niveau angehoben werden. Hierzu wurden weitere Phenylalaninderivate synthetisiert, die ein symmetrisches Substitutionsmuster enthalten. Die vielversprechendsten Resultate lieferte Xa δ , dessen δ -Positionen mit Methoxy-Gruppen substituiert wurden. Der Einbau in den hydrophoben Kern des Zinkfingerpeptids zeigte eine selektive Verbreiterung der ϵ -Protonen unter die Detektionsgrenze. Jedoch verhinderte erneut der geringe Temperaturbereich die präzisere Betrachtung. Die Kombination aus MD-Simulation, NMR-Spektroskopie und *wt*-Metadynamik ermöglichte nicht nur die Dynamik des hydrophoben Kerns zu beschreiben, sondern den Einfluss des systematischen Methyl-Hüpfens auf die Stabilität von Zinkfingerproteinen zu charakterisieren. Diese Erkenntnisse heben das Potenzial dieser Methodik für weitere Miniproteinsysteme hervor.

Die langsamsten Bewegungen wurden im dritten Strukturmotiv dieser Arbeit, dem dimeren Tetradisulfid von SCHRIMPF *et al.*,^[275] beobachtet. Vorherige Studien zeigten, dass dieses System eine gemittelte Konformation einnimmt, wobei aufgrund der V-förmigen Struktur eine scharnierartige Bewegung postuliert wurde. Da dieses Strukturmotiv bereits erfolgreich unter Erhalt der spezifischen Aktivität als Dimerisierungsdomäne von zwei biologischen Makromolekülen, dem IgG-Antikörper und LEH-Protein, verwendet wurde, sollte die Charakterisierung der postulierten Scharnier-Dynamik nicht nur isoliert, sondern auch in einer proteinnahen Umgebung erfolgen. Zwar konnten durch klassische MD-Simulation Hinweise auf eine korrelierte Dynamik erhalten werden, doch erst die Kombination aus Hauptkomponentenanalyse und *wt*-Metadynamik ermöglichten die vollständige Beschreibung der Scharnierbewegung. Diese besteht nur untergeordnet aus dem vermuteten Öffnen und Schließen und zeigt als dominante Bewegung die Verdrillung der β -*hairpins*. Um die Proteinumgebung nachzuahmen, wurde ein vier-Helix-Bündel, welches z.B. in der HAMP-Domäne vorkommt, dargestellt und dessen Dynamik in MD-Simulationen analysiert. Hierbei wurde gezeigt, dass das Strukturmotiv des Scharniers erhalten bleibt und die Verdrängung einer Helix aus dem Bündel hervorruft. Die präzise Beschreibung der Dynamik des dimeren Tetradisulfids erlaubt es in Zukunft, gezielte Scharnier-Peptide zu entwickeln, um verschiedenen Proteinen eine gerichtete Bewegung aufzuzwingen.

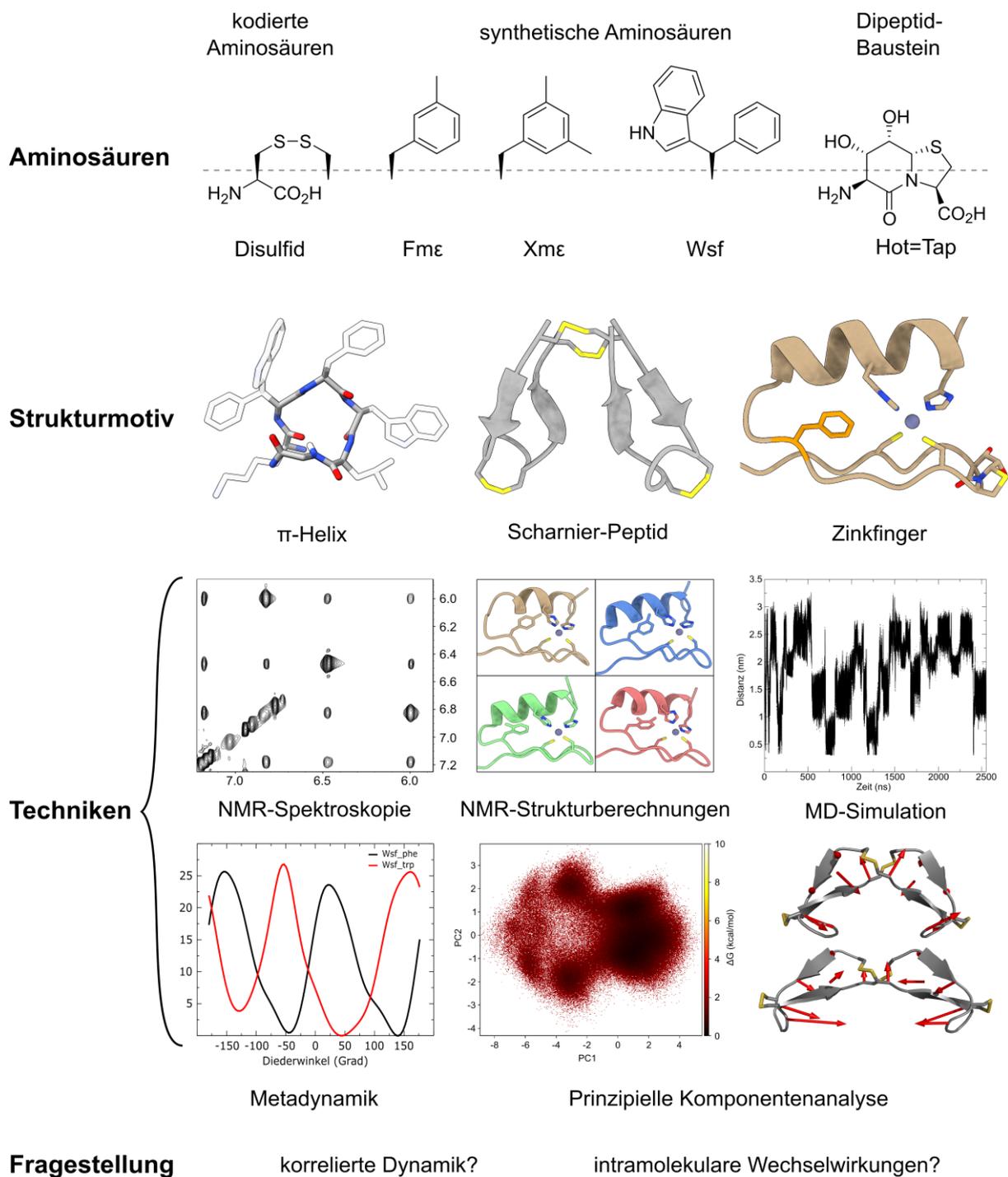


Abbildung 102: Die modulare Zusammenfassung dieser Arbeit hebt vier Segmente, Aminosäuren, Strukturmotiv, Techniken und Fragestellung hervor. Eine Funktionalität, die in dieser Arbeit intensiv beschrieben wurde, war das Disulfid, welches der Kategorie der kodierten Aminosäuren zugeordnet werden kann. Sie ist essenziell für die Scharnier-Dynamik des dimeren Tetradisulfids, die durch die Techniken der MD-Simulation und Hauptkomponentenanalyse charakterisiert wurde. Denkbar wäre jedoch auch, synthetische Aminosäuren wie Wsf in dieses System zu integrieren. NMR-Spektroskopie könnte anschließend Hinweise für neuartige korrelierte Dynamiken innerhalb des Scharnier-Peptids liefern. Diese Modularität bietet somit die Möglichkeit, durch eine beliebige Kombination aus den einzelnen Segmenten neue Fragestellungen zu etablieren.

5. Summary

The tertiary structure of a protein, which is essential for its function, is subject to permanent structural fluctuations. The reason for these movements is manifold and often the focus of numerous scientific investigations. In this work, both small amplitude, fast frequency motions and slow, directional structural changes were described. Each system was analyzed according to the same procedure. Each bioorganic molecule studied in this work exhibited correlated dynamics that were not completely characterized. Based on the initial observation, specific research questions were formulated and the corresponding concepts, based on synthetic, analytical, or theoretical methods, were developed. The results obtained, not only answered the initial research question but also provided important information for the targeted design of miniproteins. This procedure will now be explained using selected examples from this work. The chronology of the listing explicitly does not follow the outline of the chapter "Ergebnisse und Diskussion", instead, the description is based on the systematics from Figure 102.

First, the dynamics of synthetic amino acids, Wsf, a β,β -diaryl- α -amino acid hybrid, and Hot=Tap, a bicyclic turn mimetic, were characterized. The former can be considered as a combination of phenylalanine and tryptophan, but NMR spectroscopic studies by NICKE *et al.* showed evidence for dependent mobility of the side chains, so-called gearing. To test this hypothesis for its validity and to characterize the correlated dynamics, a combination of MD-Simulation and wt-Metadynamics was applied. It could be demonstrated that the energy barriers for the χ^2 -rotation were raised from 10 and 15 kJ/mol in phenylalanine and tryptophan, respectively, to 24 and 27 kJ/mol in Wsf. However, the poor interlocking of the side chains prevented consistent gearing, resulting in gear slip as the dominant mode of motion. Since the backbone of β,β -diaryl amino acids is an ideal system for gearing dynamics, quantum chemical calculations were used to postulate derivatives that exhibit ideal interlocking and energy barrier as well as being synthetically accessible. To apply the findings to a biologically relevant structural motif, NMR ensembles of a ghrelin peptide analog were generated, demonstrating that the Wsf side chain leads to stabilization of an isolated π -helix with only six amino acids. The results obtained from the characterization of the correlated dynamics of β,β -diaryl amino acids provide important principles for the design of miniproteins with specific side chain alignment.

The influence of the turn mimetic Hot=Tap has already been successfully investigated in various peptidic or even protein environments. However, the focus has often been on the direct stabilization of the structure or the changes of neighboring amino acids, respectively. Until now, it was not possible to quantify any long-range effect for Hot=Tap. To facilitate this, the synthetic building block was incorporated into another structural motif, the third zinc finger of the Yin Yang-1 protein, which forms a $\beta\beta\alpha$ -fold. It was shown that the zinc finger not only tolerates Hot=Tap in the β -turn but forms a more stable fold. Through a combination of NMR spectroscopy and molecular dynamics simulations, the long-range effect of Hot=Tap was demonstrated for the first time. The rigidity of the bicyclic system limited the flexibility of the neighboring side chains, resulting in a stronger shielding of the β -protons

of His²⁶ by the ring current effect of Phe⁶. The stabilization of the β -hairpin also had a direct effect on the dynamics of the hydrophobic core, more specifically, the rotation of Phe¹³ around χ_2 . This mobility is simultaneously part of the next question. In addition to a β -hairpin and an α -helix, the tertiary structure of the third zinc finger of the Yin Yang-1 protein also consists of a compact hydrophobic core surrounded by the secondary structural elements. During NMR spectroscopic study, a rapid rotation of Phe¹³ in the hydrophobic core, around χ_2 could be observed. This mobility led to the formation of an AA'BB'C spin system. However, a more precise characterization of this rotation according to the established methods of WÜTHRICH *et al.* was not possible because the zinc finger peptide has a strongly limited temperature range. Therefore, a strategy based on the combination of synthetic amino acids, NMR spectroscopy, MD simulations and wt-Metadynamics was designed, which allowed a temperature-independent description of the dynamics. To gain maximum information about the orientation of the phenyl ring in the hydrophobic core, the symmetry of the rotation was to be broken by synthetic modifications. For this purpose, derivatives meeting the specific requirements, systematic variability, similar polarity, synthetic accessibility and good spectroscopic properties, were developed. It could be shown that tolyl and xylyl derivatives, respectively, provide the ideal functionality for the existing challenge. As an example of this, Fme¹³ should be mentioned, whose methylation in the ϵ -position not only led to a thermodynamically extremely stable zinc finger peptide with alignment of the methyl group outside the zinc finger core, but also almost completely stopped the rotation of the phenyl ring around χ_2 . The position of the substituent plays a crucial role in the mobility, as methylation of the δ -position, Fm δ ¹³, also slows down the rotation, but NMR spectroscopy demonstrated the alignment to the interior of the peptide with a ratio of 70/30. In addition to the single modification, derivatives were synthesized that contained a double methylation of the phenyl ring. Due to the different arrangement possibilities (syn or anti), the influence of a single methyl group could be specified. Of particular note is Fxp¹³ with the opposite methylation pattern, whose rotation was slowed down so much that a selective broadening of the aromatic protons at room temperature was observed in the ¹H-NMR. Again, wt-Metadynamics were used to precisely characterize the energy barriers. Here it was shown that each substitution pattern resulted in a different barrier depending on the arrangement and nature of the substituents. Once again, Fxp¹³ should be mentioned here, whose energy barrier turns out to be lower than that of native phenylalanine. The comparison of the energy profiles also allowed the quantification of the long-range effect of Hot=Tap, since the incorporation of this amino acid almost doubled the energy barrier of the Phe¹³ rotation compared to the native zinc finger. Nevertheless, should there be a desire to analyze the mobility by temperature gradients, the rotation barrier would need to be raised to an appropriate level. For this purpose, additional phenylalanine derivatives containing a symmetric substitution pattern were synthesized. The most promising results were obtained with Xa δ , whose δ -positions were substituted with methoxy groups. Incorporation into the hydrophobic core of the zinc finger peptide showed selective broadening of the ϵ -protons below the detection limit. However, again the low temperature range prevented more precise characterization. The combination of MD simulation, NMR spectroscopy,

and wt-Metadynamics allowed not only to describe the dynamics of the hydrophobic core, but also to characterize the influence of systematic methyl hopping on the stability of zinc finger proteins. These findings highlight the potential of this methodology for other miniprotein systems.

The slowest motions were observed in the third structural motif of this work, the dimeric tetradisulfide investigated by SCHRIMPF *et al.* Previous studies showed that this system adopts an averaged conformation, with a hinge-like motion postulated due to the V-shaped structure. Since this structural motif has already been successfully used as a dimerization domain of two biological macromolecules, the IgG antibody and LEH protein, with preservation of specific activity, characterization of the postulated hinge dynamics should be performed not only in isolation but also in a protein environment. Although indications of correlated dynamics could be obtained by classical MD simulation, only the combination of principal component analysis and wt-Metadynamics allowed the complete description of the hinge motion. This consists only subordinately of the presumed opening and closing and shows the twisting of the β -hairpins as the dominant motion. To mimic the protein environment, a four-helix bundle, occurring for example in the HAMP domain, was represented and its dynamics analyzed by MD simulations. Here, it was shown that the structural motif of the hinge is conserved and causes the displacement of one helix from the bundle. The precise description of the dynamics of the dimeric tetradisulfide will allow the future design of specific hinge peptides to impose directional restrictions on various proteins.

6. Ausblick

Die Betrachtung von potenziellen weiterführenden Anwendungen und Untersuchungen kann entweder anhand der spezifisch untersuchten Miniproteinsysteme oder des modularen Aufbaus aus Abbildung 102 erfolgen. Zunächst soll sich hierbei auf die einzelnen Systeme konzentriert werden.

Die Charakterisierung der Dynamik von Scharnier-Peptiden legte den Grundstein für zukünftige Applikationen im Bereich der bioorganischen Makromoleküle. Aufbauend auf der Betrachtung des einzelnen Peptids mit minimaler Änderung der Sequenz, könnten zusätzliche Experimente sich auf die Kompatibilität mit weiteren Sekundärstrukturmotiven fokussieren. Aufgrund der Komplexität dieser potenziellen Anwendungen wurde nur ein Beispiel, das Scharnier-Peptid in Kombination mit einem vier-Helix-Bündel, oberflächlich untersucht. Bereits diese Ergebnisse akzentuierten jedoch den Einfluss des dimeren Tetradisulfids auf die Beweglichkeit der vier Helices. Um weitere Erkenntnisse zu erhalten, sollte die Synthese dieses, oder ähnlicher Struktur motive erfolgen und die Ergebnisse mit den Simulationen verglichen werden. Die Gegenüberstellung des antiparallel-verknüpften Scharniers mit einem Modellpeptid, einer natürlichen parallel-verknüpften Scharnier-Region – dem IgG-Antikörper, enthüllte die speziellen Charakteristika beider Verbindungen. Eine Fusion dieser Systeme wurde auf experimenteller Ebene bereits von SCHRIMPF *et al.*^[415] durchgeführt und das entsprechende Protein auf seine biologische Wirkung untersucht. Der Erhalt der Aktivität sprach für eine korrekte Darstellung der Antikörperstruktur mit einer antiparallelen Scharnier-Region. Aufbauend auf diesen vorläufigen Ergebnissen könnten fortführende synthetische, analytische und theoretische Untersuchungen zu dieser Verbindungsklasse in Bezug auf Dynamik und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen durchgeführt werden. Die Modifikationen innerhalb des Scharnier-Peptids führten zur selektiven Einschränkung oder Erweiterung der Beweglichkeit. Ausgehend von dieser Erkenntnis könnten monoklonale Antikörperderivate mit benötigter Stabilität generiert werden. Eine zentrale Charakteristik des Scharnier-Peptids ist neben der gerichteten Dynamik und Stabilität die Funktion als Dimerisierungsdomäne. SCHRIMPF *et al.*^[415] zeigten neben dem Beispiel des Antikörpers auch ein weiteres biologisches Makromolekül, das Limonen-Epoxid-Hydrolase-Enzym, welches über das Tetradisulfid verknüpft werden konnte. Um das Potenzial dieses Struktur motifs als Dimerisierungsdomäne weiter hervorzuheben, könnten weitere, auch kleinere Strukturen verbunden werden. In Kombination mit der theoretischen Charakterisierung der Beweglichkeit könnte das Anwendungsgebiet dieser Strukturklasse erweitert werden.

Als Motivation für die Charakterisierung der Dynamik des zentralen Phenylalanin¹³ im hydrophoben Kerns von Zinkfingerpeptiden durch synthetische und theoretische Methoden diente der limitierte Temperaturbereich, der dem System zur Verfügung steht. Bereits der Einbau von Hot=Tap als *turn*-Mimetikum führte zur Steigerung der thermodynamischen Stabilität. Zusätzliche Modifikationen mit natürlichen oder synthetischen Aminosäuren, ausgeweitet auf die gesamte Sequenz, könnten die Temperaturstabilität erhöhen, sodass Untersuchungen der Rotationsbeweglichkeit durch *vt*-NMR-

Spektroskopie ermöglicht werden. Eine Ursache für die Restriktionen der Lösungsmittelzusammensetzung bei klassischen Zinkfingerpeptiden ist die unabdingbare Anwesenheit von Zink-Ionen. Würde diese Notwendigkeit durch Stabilisierung der Struktur wegfallen, könnten cryoprotektive Lösungsmittelgemische angewandt werden, um eine Erweiterung des verfügbaren Temperaturbereichs zu erzielen. Einen Ansatz hierzu lieferten CABALTEJA *et al.* die durch zwei Disulfidbrücken das $\beta\beta$ -Strukturmotiv derart stabilisieren konnten, dass auf die Anwesenheit von Zink-Ionen verzichtet werden konnte.^[487] Ein anschließender Einbau der in dieser Arbeit etablierten asymmetrisch oder symmetrisch substituierten Phenylalaninderivate könnte es erlauben, die Energiebarriere durch NMR-spektroskopische Methoden vollständig charakterisieren zu können (**Abbildung 103**).

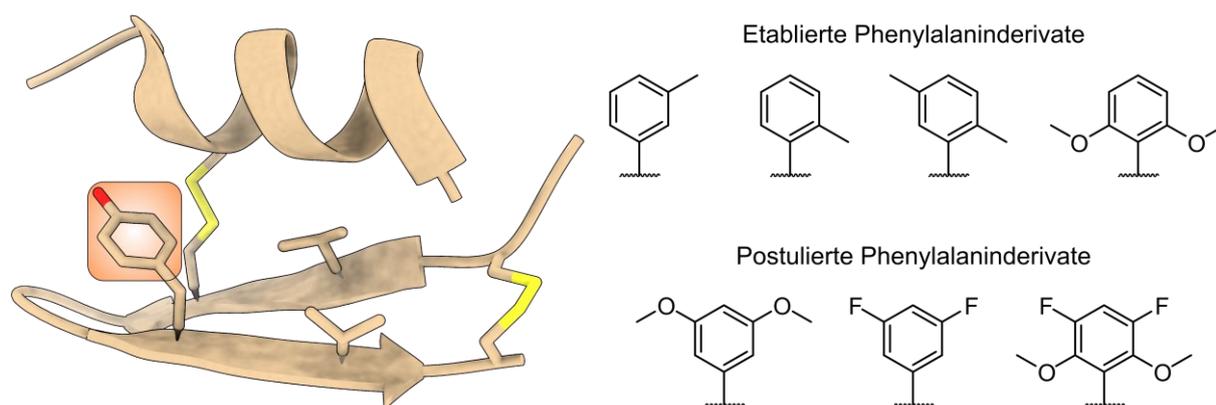


Abbildung 103: Denkbare synthetisches $\beta\beta$ -Strukturmotiv (CABALTEJA *et al.*^[487] PDB: 6E5I), dessen erhöhte thermodynamische Stabilität den Einbau von etablierter Phenylalaninderivate ermöglichen würde, um die Dynamik der aromatischen Seitenkette zu erforschen. Weiterhin könnten zusätzliche symmetrische Substitutionsmuster mit Heterokernen dargestellt werden, wodurch Signalüberlappungen reduziert werden könnten (^{19}F -NMR-Spektroskopie).

Neben den bereits untersuchten Derivaten können Substitutionsmuster postuliert werden, die zusätzlich zum erhöhten sterischen Anspruch eine selektive Detektion der Verbreiterung einzelner Signale ermöglichen. Wegen den exzellenten spektroskopischen Eigenschaften (natürliche Häufigkeit und gutes gyromagnetisches Verhältnis) könnten ^{19}F -Substitutionen die Signalverbreiterung bei langsamer Rotation ohne störende Überlappungen, wie sie im ^1H -NMR sichtbar ist, beobachtet werden. Weiterhin ist eine Vielzahl an unterschiedlichen Funktionalitäten über die etablierte Synthesestrategie, aufbauend auf der NEGISHI-Kreuzkupplung als Schlüsselreaktion eingeführt werden. Selbst sterisch äußerst anspruchsvolle Phenyllderivate können über diese Methode dargestellt werden. Da schon frühe Studien eine Relation zwischen DNA-Bindungsaffinität und Zusammensetzung des hydrophoben Kerns herstellen konnten, wären biologische Tests der, im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Zinkfingervarianten von großem Interesse.^[156] Hierzu wäre zunächst die Synthese der entsprechenden Zinkfingerproteine erforderlich, da eine einzelne Domäne des Yin Yang-1 Proteins nicht in der Lage ist, DNA zu binden. Zwar wurde die Methodik des systematischen Methyl-Hüpfens in Kombination mit Moleküldynamik-Simulationen und Metadynamiken am Beispiel des Zinkfingerpeptids etabliert, dies begrenzt ihre Anwendbarkeit jedoch nicht auf dieses System. Da eine Vielzahl an Mini-proteinen über

einen hydrophoben Kern verfügen (s. Kapitel 1.2), könnte diese Methode auch auf Systeme wie dem Tryptophankäfig, dem Kopfstück des Villin-Proteins oder gar dem Foldon übertragen werden. Denkbar ist auch, dass diese synthetischen Aminosäuren an Positionen etabliert werden, die keine aromatische Seitenkette enthalten um dadurch wertvolle Erkenntnisse für das Design von stabileren Miniproteinen erhalten zu können.

Nach Charakterisierung der Dynamik von "nativen" β,β -Diaryl-Aminosäurehybriden wäre der nächste logische Schritt die Synthese der postulierten Derivate (s. Kapitel 3.3.3). *Ab initio* Berechnungen identifizierten niedrige Energiebarrieren mit einer hohen Verzahnung, wodurch *gearing* innerhalb der Seitenkette stattfinden könnte. Da eine alleinige Identifikation dieser Bewegung aufgrund analytischer Methoden schwierig ist, könnten Moleküldynamik-Simulationen in Kombination mit Metadynamiken durchgeführt werden. Da mit zunehmendem artifiziellem Charakter der Seitenkettenfunktionalität die Übertragbarkeit der Parameter von natürlichen Aminosäuren erschwert wird, könnten nach potenzieller Identifikation einer *gearing*-Dynamik die Verfeinerung dieser Variablen anhand quantenmechanischer Berechnungen erfolgen. Dadurch könnte nicht nur die Beweglichkeit dieser Derivate in unterschiedlichen Umgebungen besser dargestellt, sondern der Parametersatz an die wissenschaftliche Gemeinschaft weitergeben werden, um zusätzliche Studien zu dieser Stoffklasse zu erleichtern. Durch die gewonnenen Erkenntnisse könnten Richtlinien für das Design von verzahnten Aminosäurehybriden erhalten werden, wodurch das präzise Einstellen des *gearings* fasziliert werden könnte. Dieser Satz an neuartigen β,β -Diaryl-Aminosäurehybriden mit unterschiedlicher Seitenkettendynamik könnte anschließend in biologisch relevante Peptide, wie dem in dieser Arbeit vorgestellten künstlichen Wachstumshormon-Sekretagon GHS, eingebaut werden um Konformations-Aktivitäts-Beziehungen zu erforschen und ultimativ interessante Kandidaten für fortführende Medikamentenentwicklung zu identifizieren.

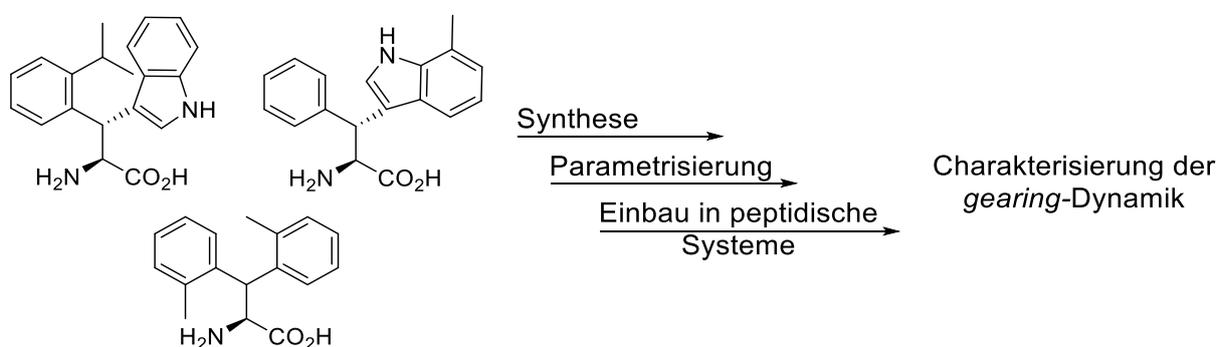


Abbildung 104: Weiterführende experimentelle und theoretische Strategie zur Charakterisierung der *gearing*-Dynamik von postulierten β,β -Diaryl-Aminosäurehybriden. Nach erfolgreicher Synthese und analytischer Datenerhebung könnte die Generierung von Parametern für Moleküldynamik-Simulationen erfolgen. Anschließend könnten durch den Einbau in peptidische Systeme neuartige Medikamente entwickelt werden.

Abseits der *gearing*-Thematik konnte gezeigt werden, dass der Einbau von wsf in die Sequenz des GHS zur Stabilisierung beiträgt, wodurch eine isolierte π -Helix ausgebildet werden konnte. Diese Erkenntnisse legen den Grundstein für zukünftige Untersuchungen dieses Strukturmotivs bezüglich

Stabilität, Dynamik und biologische Aktivitäten und eröffnen ein neues Kapitel im Bereich des Designs von Miniproteinen. Zukünftige Arbeiten sollten sich auf weitere Modifikationen der Sequenz fokussieren, wodurch die thermodynamische Stabilität dieser Struktur erhöht werden könnte. Da die Aminosäuren des GHS in ihrer Funktionalität sehr begrenzt sind, könnte nach Stabilisierung des Motivs die Elongation mit hoch funktionalisierten Aminosäuren durchgeführt werden, wodurch eine isolierte hochmodifizierte π -Helix designt werden könnte.

Der modulare Aufbau dieser Arbeit ermöglicht es, durch eine Kombination der einzelnen Abschnitte aus Abbildung 102 neuartige Fragestellungen zu konzipieren. So wäre es denkbar, die korrelierte Dynamik des Scharnier-Peptids mit der gezielten Seitenkettenausrichtung von β,β -Diaryl- α -Aminosäurehybriden zu kombinieren. Dieses Strukturmotiv kann anschließend mit der Vielzahl an etablierten Techniken analysiert werden, um neue Erkenntnisse für das Design von Miniproteinen zu erhalten.

7. Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine Anmerkungen

Lösungsmittel

Sämtliche Lösungsmittel wurden vor der Verwendung destillativ von Verunreinigungen befreit. Als Ausnahme ist hierbei DMF zu führen, das in der Reinheit *peptide grade* von der Firma Iris Biotech erworben wurde. Falls benötigt, erfolgte die Trocknung der Lösungsmittel über Molsieb (3Å), das vorher über 24 h bei 300 °C und Feinvakuum aktiviert wurde.

Reagenzien

Alle kommerziell erworbenen Reagenzien wurden ohne weitere Reinigungsschritte direkt verwendet. Zinkstaub wurde vorher von seiner Oxidschicht befreit, indem eine definierte Menge in 0.5 M HCl-Lösung für mehrere Stunden rühren gelassen wurde. Anschließend wurde die Suspension filtriert und mehrmals mit Wasser gewaschen. Nach Entfernung der Lösungsmittelreste im Vakuum bei erhöhter Temperatur konnte der so aktivierte Zinkstaub für mehrere Wochen unter Argon gelagert werden.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Aluminium-DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F254 der Firma MERCK wurden für sämtliche dünnschichtchromatographische Reaktionskontrollen verwendet. Die Detektion erfolgte entweder durch Fluoreszenzauslöschung mit einer UV-Lampe ($\lambda = 254 \text{ nm}$) oder unter der Verwendung von Farbreagenzien. Folgende Lösungen etablierten sich durch ihre Fähigkeit selektiv verschiedene funktionelle Gruppen nach Erwärmen der DC-Platte mit einem Heißluftföhn sichtbar zu machen.

| | |
|--------------------------|--|
| Ninhydrin-Lösung | für die Detektion von Aminogruppen |
| Kaliumpermanganat-Lösung | für die Detektion von oxidierbaren funktionellen Gruppen |
| Iod-Kammer | allgemeines Anfärbereagenz von verschiedenen Gruppen |

Flash-Säulenchromatographie

Die präparative Aufarbeitung mittels Säulenchromatographie erfolgte unter Verwendung eines Überdrucks, der durch Druckluft generiert wurde und im Bereich von 1 bar lag. Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 M (Partikelgröße 0.040-0.063 mm / *mesh* 230-400) der Firma MACHEREY-NAGEL verwendet.

Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-Spektren (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, DFQ-COSY, TOCSY, ROESY, NOESY) wurden, falls nicht anders angegeben, bei einer Temperatur von 300 K gemessen. Die Routinemessungen wurden am Bruker AV 300 (300.13 MHz) durchgeführt, während die Auftragsmessungen entweder durch das Personal der NMR-Abteilung am AVANCE 500 (500.13 MHz) oder per Selbstmessung am AVANCE 600 (600.13 MHz) erfolgten. Die Angabe der chemischen Verschiebung (δ) erfolgt in *parts per million* (ppm) und wurde aus den Signalmitten abgelesen. Handelte es sich um ein Multiplett, wurde jeweils der gesamte Bereich des Signals angegeben, wobei die Form der Multiplizität phänomenologisch beschrieben wurde. Die Kopplungskonstanten werden in Hertz (Hz) angegeben. Multiplizitäten wurden mit s für Singulett, d für Duplett, dd für Duplett vom Dublett, t für Triplett und m für Multiplett angegeben. Zur Kalibration wurde das Signal des Lösungsmittels (DMSO-d₆: ^1H : $\delta = 2.50$ ppm, ^{13}C : $\delta = 39.5$ ppm; CDCl_3 -d₁: ^1H : $\delta = 7.26$ ppm, ^{13}C : $\delta = 77.0$ ppm) verwendet. Die Messungen am Hochfeld der Peptide wurden in einem Gemisch aus $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) mit Wasserunterdrückung durchgeführt. HSQC-Spektren wurden, falls nicht anders angegeben in einem spektralen Bereich von 0-100 ppm aufgezeichnet. Als interner Standard für Messungen im wässrigen Milieu diente Natriumtrimethylsilylpropionat, TSP-d₄ (Resonanzsignal ^1H : $\delta = 0.00$ ppm).

Massenspektrometrie

Die ESI(+/-), sowie LCMS Messungen wurden von den Mitarbeitern der massenspektroskopischen Abteilung an einem *Finnigan* LTQ-FT von THERMO FISCHER SCIENTIFIC durchgeführt. Die Peptidmessungen wurden zur erfolgreichen Detektion an einem AGILENT 1100 Series durchgeführt. Die angegebenen Werte spiegeln dabei die Masse-zu-Ladung-Verhältnisse wider.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

HPLC Messungen wurden an einer UltiMate 3000 UHPLC+ *focused* von THERMO SCIENTIFIC bei Raumtemperatur durchgeführt. Für analytische Messungen wurde eine ACE 3 C18-Säule (3 μm , 3mm x 150 mm) verwendet, während für präparative Aufreinigungen eine C18-Säule VP125/21 Nucleodur C18 gravity der Firma MACHEREY-NAGEL verwendet wurde. Das Laufmittelgemisch bestand aus zwei Komponenten A = Wasser + 0.1% TFA und B = Acetonitril + 0.085% TFA, wobei jeweiligen Gradienten bei den einzelnen Verbindungen angegeben sind. Die angegebenen Retentionszeiten entsprechen der absoluten Retentionszeit, da kein Standard als Totzeitmarker verwendet wurde. Für die präparativen Aufreinigungen wurde die Wellenlänge 215 nm zur Separation der Signale verwendet.

Festphasenpeptidsynthese (SPPS)

Die Darstellung sämtlicher Peptide innerhalb dieser Arbeit erfolgte durch Verwendung der Festphasenstrategie, nach MERRIFIELD. Zunächst erfolgte die manuelle Harzbeladung in einer Spritzenfritte, wobei 2-Chlortritylchlorid als Linker auf einem Polystyrolharz (1% Divinylbenzol, 100-200 *mesh*, 1.55 mmol/g) verwendet wurde. Das Harz wurde 30 min in DMF gequell und anschließend mit 2.0 eq. der entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäure und 8.00 eq DIPEA versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand mit je dreimal DMF und DCM gewaschen. Das *Capping* wurde mit einem Gemisch aus DCM/MeOH/DIPEA (80:15:5) durchgeführt, welches 30 Minuten lang mit gerüttelt wurde. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Abschließend wurde das Harz mit DMF, MeOH, DCM, jeweils zweimal gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Die Bestimmung der Harzbeladung erfolgt durch eine Abspaltprobe einer genau definierten Menge Harz, die für 30 Minuten zu einer 1 mL Piperidin-Lösung (25% in DMF) hinzugegeben wurde. Die Suspension wurde mit 5.0 mL Methanol verdünnt und die Absorption des entstandenen Fluoren-Derivats bei 289, sowie 300 nm gemessen. Anschließend konnte die Beladung anhand der folgenden Gleichung bestimmt werden.

$$B \left(\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right) = \frac{E \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot m}$$

Wobei B für Harzbeladung, E für Extinktion, V für das verwendete Volumen, ε für den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten, d für die Dicke der Küvette und m für die eingesetzte Harzmenge (1 mg) steht. Das mit der entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäure beladene 2-Chlortritylharz wurde in der Fritte des *LibertyBlue* hinzugegeben und für 30 Minuten in wenig DMF quellen gelassen. Die Verwendung des *LibertyBlue* ermöglichte eine mikrowellenunterstützte Synthese mit geringerem Zeit- und Lösungsmittelaufwand. Die Synthese erfolgte nach einem Standard-Protokoll:

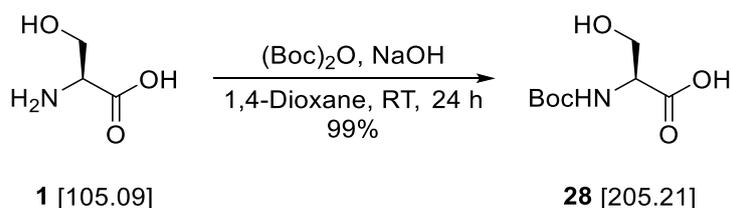
- Fmoc-Abspaltung: T = 50°C (30 W), 3 min, Piperidin (20%ig in DMF)
- Kupplung der Aminosäuren:
 - Alle außer Fmoc-Arg(Pbf)-OH: T = 50°C (30W), 10 min, DIC/Oxyma, 5 eq, der Aminosäure
 - Für Fmoc-Arg(Pbf)-OH: T= 25°C (0 W), 25 min, T= 50°C (30 W), 10 min, DIC/Oxyma, 5 eq, der Aminosäure
- Waschen: 3x mit DMF nach Fmoc-Abspaltung.

Die Ansatzgröße der Peptide betrug dabei 0.05-0.1 mmol. Nach erfolgreicher Darstellung der gewünschten Sequenz, wurde das Harz aus der Fritte des *LibertyBlue* in eine Glasfritte überführt. Das Harz wurde jeweils viermal mit DMF und DCM gewaschen und anschließend das Lösungsmittel entfernt und das Harz im Hochvakuum getrocknet. Danach erfolgte die Zugabe der Abspalllösung. Diese bestand aus einer Mischung von TFA/H₂O/Phenol/Thioanisol/DODT/TIPS, in einem Verhältnis von 83:6:4:4:2:1. Die Abspaldauer wurde auf 4 Stunden und 30 Minuten festgelegt, um sämtliche Schutzgruppen der Seitenketten zu entfernen. Es wurden ca. 5 mL Abspalllösung hinzugegeben. Nach

der Reaktionszeit wurde die Lösung abgezogen, mit Abspaltlösung nachgewaschen und ein Fällungstest in kaltem Diethylether durchgeführt. Sollte keine Fällung stattgefunden haben, wurde das Filtrat eingeeengt und erneut gefällt. Die etherische Suspension wurde zentrifugiert, das Lösungsmittel abdekantiert und der Rückstand am Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde das Rohpeptid in wenig Wasser/Acetonitril (4:1) gelöst, eingefroren und an einer Alpha 2-4 LD Lyophylle der Firma CHRIST lyophyllisiert. Die im weiteren Verlauf erwähnten Molmassen der dargestellten Peptide beziehen sich auf die Reinpeptide, ohne die entsprechenden Trifluoracetat-Gegenionen. Da eine nicht definierte Anzahl von unbekanntem Salzen, sowie Peptidfragmenten, die während der Abspaltung entstehen können, die genaue Bestimmung der Molmassen verhindern, wurde auf die Angabe von Ausbeuten bezüglich der Rohpeptide verzichtet. Sämtliche Rohpeptide wurden durch präparative HPLC aufgereinigt und wiesen anschließend eine Reinheit von >90% auf.

7.2 Synthese von Aminosäurebausteinen

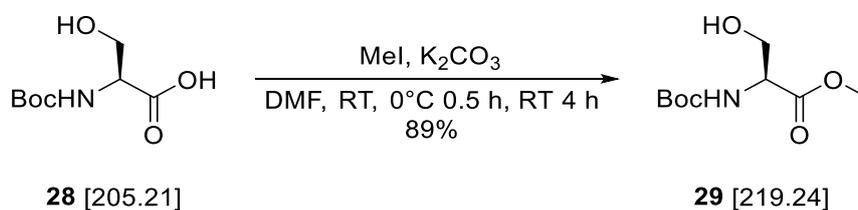
Darstellung von Boc-L-Serin



L-Serin (**1**, 3.00 g, 28.5 mmol, 1.00 eq) wurde in 35 mL 1M NaOH gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Bocanhydrid (7.10 g, 35.6 mmol, 1.25 eq) in 25 mL 1,4-Dioxan gelöst und zur Reaktionslösung hinzugegeben. Nach 0.5 h wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion für 24 h rühren gelassen. 1,4-Dioxan wurde unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Phase mit Diethylether (2x20 mL) extrahiert. Anschließend wurde zur wässrigen Phase 60 mL Ethylacetat hinzugegeben und mittels 1M Schwefelsäure der pH-Wert auf 2 eingestellt. Die Phasen wurden separiert und die wässrige Phase mit Natriumchlorid gesättigt. Anschließend wurde die wässrige Phase Ethylacetat (4x) extrahiert. Die organische Fraktion wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 5.79 g (28.2 mmol, 99%) von Boc-L-Serin **28** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 300 MHz, DMSO_{d6}, δ = 6.68 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, NH), 3.96 (dd, ³J = 8.0 Hz, 4.3 Hz, 1H, H_α), 3.61 (d, ³J = 4.3 Hz, 2H, H_β), 1.38 (s, 9H, Boc).

Darstellung von Boc-L-Serin-OMe



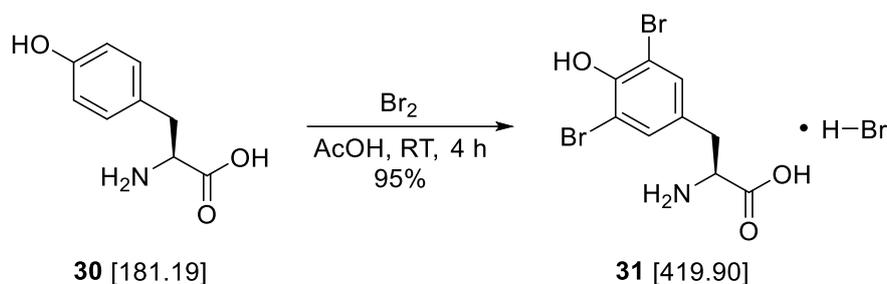
Boc-L-Serin (**28**, 2.00 g, 9.75 mmol, 1.00 eq) wurde in 15 mL DMF vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und anschließend wurde Kaliumcarbonat (1.48 g, 10.73 mmol, 1.10 eq) hinzugegeben. Zu dieser Suspension wurde eine Lösung aus Methyljodid (1.28 mL, 20.5 mmol, 2.10 eq) in 10 mL DMF langsam hinzugegeben. Nach 30 min wurde die Suspension auf Raumtemperatur aufgewärmt und für 4 h rühren gelassen. Der Feststoff wurde abfiltriert, das Filtrat mit Wasser versetzt und mit Ethylacetat (3x) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser und *brine* gewaschen und anschließend getrocknet über Magnesiumsulfat. Filtration und Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck lieferten das Rohprodukt. Säulenchromatographische Reinigung (EtOAc/Cyclohexan 1:1) führten zur Isolation von Boc-L-Serin-OMe **29** als hochviskose farblose Flüssigkeit (1.90 g, 8.67 mmol, 89%).

¹H-NMR: 300 MHz, DMSO_{d6}, δ = 6.92 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, NH), 4.88 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H, OH), 4.11-4.02 (m, 1H, H_α), 3.65-3.59 (m, 5H, H_β, OMe), 1.38 (s, 9H, Boc).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 171.4 (COOMe), 155.2 (COOtBu), 78.3 (C(CH₃)₃), 61.3 (C_β), 56.2 (C_α), 51.7 (COOCH₃), 28.1 (C(CH₃)₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₉H₁₇NO₅Na⁺]: 242.0999, gef.: 242.1000.

Synthese von Di-Bromo-L-Tyrosin-Hydrobromid



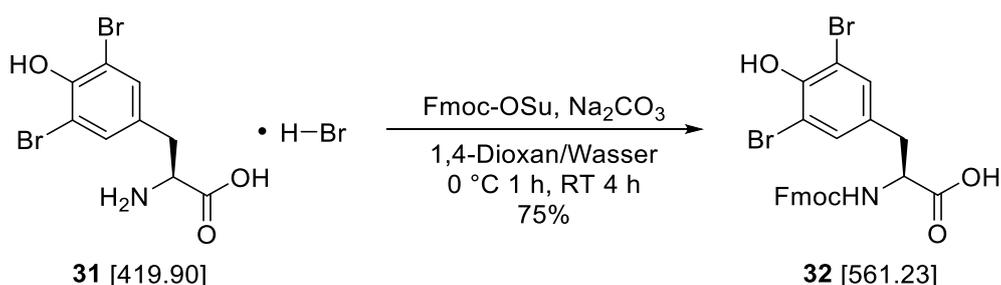
Brom (2.26 mL, 44.16 mmol, 4.00 eq) wurde in 10 mL Eisessig gelöst und anschließend langsam zu einer Suspension aus L-Tyrosin (2.00 g, 11.04 mmol, 1.00 eq) in 20 mL Eisessig hinzugegeben. Die Suspension wurde 4 h rühren gelassen und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde Di-Bromo-L-Tyrosin (**31**, 4.40 g, 10.49 mmol, 95%) als beiges HBr-Salz erhalten.

¹H-NMR: 300 MHz, DMSO_{d6}, δ = 13.9 (bs, 1H, COOH), 9.90 (s, 1H, C_{arom}-OH), 8.20 (bs, 3H, NH₃⁺) 7.44 (s, 2H, H₂), 4.22 (t, ³J = 6.2 Hz, 1H, H_α), 3.05 (dd, ²J = 14.4 Hz, ³J = 6.2 Hz, 1H, H_β), 2.96 (dd, ²J = 14.4 Hz, ³J = 6.2 Hz, 1H, H_β).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 170.3 (COOH), 150.0 (C₄), 133.3 (C₂), 129.1 (C₁), 111.9 (C₃), 52.8 (C_α), 33.9 (C_β).

HRMS (ESI+): ber. für [C₉H₉Br₂NO₃H⁺]: 339.9002, gef.: 339.9002.

Darstellung von Fmoc-Di-Brom-L-Tyrosin



Di-Bromo-L-Tyrosin (**31**, 1.00 g, 2.38 mmol, 1.00 eq) wurden in 20 mL Wasser gelöst und mit Natriumcarbonat (1.26 g, 11.9 mmol, 5.00 eq) portionsweise versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 0 °C gekühlt und langsam eine Lösung aus Fmoc-OSu (0.88 g, 2.62 mmol, 1.10 eq) in 20 mL 1,4-

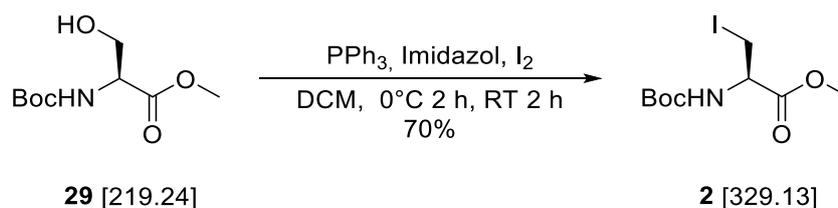
Dioxan hinzugegeben. Die Lösung wurde über 1 h auf RT erwärmt und 4 h lang gerührt. Es wurden mit 40 mL Wasser verdünnt und mit Ethylacetat (3x) extrahiert. Die wässrige Phase wurde auf pH=2-3 eingestellt und erneut extrahiert mit Ethylacetat (3x). Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Chromatographische Reinigung (Dichlormethan:Methanol:Essigsäure 20:1:0.05) lieferte Fmoc-Di-Brom-L-Tyrosin (**32**, 1.00 g, 1.78 mmol, 75%).

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO_{d6}, δ = 7.88 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.75 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, NH), 7.64 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.62 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.48 (s, 2H, H₂), 7.40 (dt, ³J = 7.5, 3.4 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.31 (dt, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.29 (dt, ³J = 7.6 Hz, ²J = 1.0 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 4.22-4.16 (m, 3H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH), 4.13 (ddd, ³J = 10.4, 8.5, 4.5 Hz, 1H, H_α), 3.00 (dd, ²J = 13.3 Hz, ³J = 4.4 Hz, 1H, H_β), 2.75 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 10.8 Hz, 1H, H_β).

¹³C-NMR: 125 MHz, DMSO_{d6}, δ = 172.7 (COOH), 155.8 (Fmoc-CO), 149.5 (C₄), 143.8, 141.3 (Fmoc-C_{arom}), 133.0 (C₁), 132.6 (C₂), 127.4, 127.2, 125.0, 120.0 (Fmoc-CH_{arom}), 112.3 (C₃), 65.6 (Fmoc-CH₂), 55.1 (C_α), 46.5 (Fmoc-CH), 34.7 (C_β).

HRMS (ESI-): ber. für [C₂₄H₁₈Br₂NO₅]: 559.9528, gef.: 559.9536.

Synthese von Boc-Iod-L-Ala-OMe



Triphenylphosphan (7.81 g, 29.79 mmol, 1.00 eq) wurde in einem Schlenkkolben vorgelegt und mit 100 mL Dichlormethan versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Imidazol (2.03 g, 29.79 mmol, 1.00 eq). Nach vollständigem Auflösen der Feststoffe wurde die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt und mit Iod (9.07 g, 35.74 mmol, 1.20 eq) in vier Portionen versetzt über 10 min versetzt und nach erfolgreicher Zugabe für weitere 40 min gerührt. Boc-L-Ser-OMe (**29**, 6.53 g, 29.79 mmol, 1.00 eq) wurde in DCM (40 mL) gelöst und über 10 min hinzugegossen. Die Mischung wurde für 1 h bei 0°C und anschließend für 2 h bei Raumtemperatur rühren gelassen. Nach vollständiger Reaktion wurde die Lösung gewaschen mit Wasser (2x), ges. Natriumthiosulfatlösung und *brine*. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufarbeitung (DCM) des Rohprodukts lieferte Boc-Iod-L-Ala-OMe (**2**, 6.86 g, 20.85 mmol, 70%) als blass-gelben Feststoff.

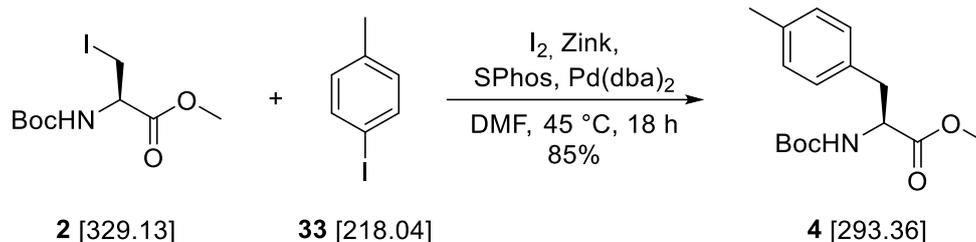
¹H-NMR: 300 MHz, DMSO_{d6}, δ = 7.39 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, NH), 4.24 (dt, ³J = 8.7, 4.9 Hz, 1H, H_α), 3.66 (s, 3H, OMe) 3.49 (dd, ²J = 10.4 Hz, ³J = 4.7 Hz, 1H, H_β), 3.32 (dd, ²J = 10.4 Hz, ³J = 9.0 Hz, 1H, H_β), 1.39 (s, 9H, Boc).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 169.7 (COOMe), 155.0 (Boc-CO), 78.7 (C(CH₃)₃), 55.3 (C_α), 52.3 (OMe), 28.1 (C(CH₃)₃), 4.6 (C_β).

HRMS (ESI+): ber. für [C₉H₁₆INO₄Na] [M+Na]⁺: 352.0016, gef.: 252.0027.

DC: R_f = 0.58 (Cyclohexan:Ethylacetat 3:1)

Synthese von Boc-L-Fmζ-OMe



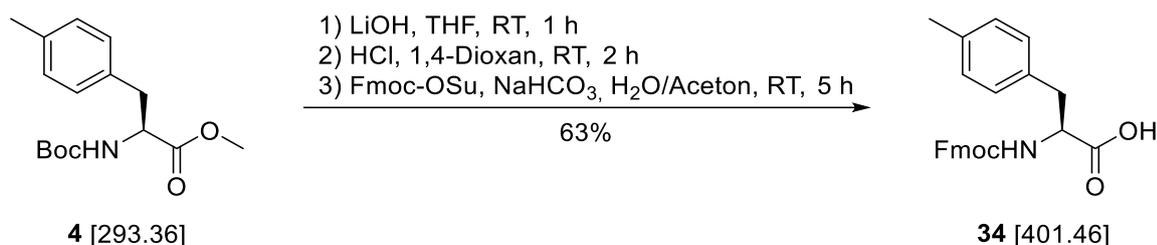
Zuvor aktiviertes Zink (297 mg, 4.56 mmol, 3.00 eq) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben gegeben und mit 3 mL DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Iod (57 mg, 0.23 mmol, 0.15 eq). Nach 5 min wurde erneut Iod (57 mg, 0.23 mmol, 0.15 eq) und Boc-Iodalanin-Methylester (**2**, 500 mg, 1.52 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben, woraufhin eine exotherme Reaktion einsetzte. Nach vollständiger Insertion des Zinks (30 min) wurden Pd(dba)₂ (87 mg, 0.15 mmol, 0.10 eq), SPhos (62 mg, 0.15 mmol, 0.10 eq) und 1-Iodo-4-methylbenzen (**33**, 430 mg, 1.97 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 45 °C für 18 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit Ethylacetat verdünnt und über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser und *brine* gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatografisch gereinigt (Toluol:Ethylacetat 19:1) und es wurden 380 mg (1.29 mmol, 85%) von Boc-L-Fmζ-OMe **4** als brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO_{d6}, δ = 7.23 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, NH), 7.10 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H, CH_{arom}), 7.07 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H, CH_{arom}), 4.12 (ddd, ³J = 9.7, 8.1, 5.3 Hz, 1H, H_α), 3.59 (s, 3H, OMe), 2.93 (dd, ²J = 13.6 Hz, ³J = 5.0 Hz, 1H, H_β), 2.80 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 9.7 Hz, 1H, H_β), 2.25 (s, 3H, C4-CH₃), 1.32 (s, 9H, Boc).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 172.6 (COOMe), 155.2 (Boc-CO), 135.4 (C₄), 134.4 (C₁), 128.9 (C₃), 128.7 (C₂), 78.2 (C(CH₃)₃), 55.3 (C_α), 51.7 (OMe), 36.0 (C_β), 28.1 (C(CH₃)₃), 20.6 (C4-CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₁₆H₂₃NO₄Na] [M+Na]⁺: 316.1519, gef.: 316.1521.

DC: R_f = 0.24 (Toluol:Ethylacetat 19:1)

Darstellung von Fmoc-L-Fm ζ


Das Phenylalaninderivat **4** (370 mg, 1.27 mmol, 1.00 eq) wurde in 6.5 mL THF gelöst und mit Lithiumhydroxid (1M in Wasser, 6.5 mL, 6.50 mmol, 5.12 eq) versetzt. Nach 1 h rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 2M Salzsäure auf pH=2 gebracht und mit Ethylacetat (3x) extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe von HCl in 1,4-Dioxan (4M, 2.0 mL, 8.00 mmol, 6.30 eq). Nach 2 h wurde Argon durch die Reaktionslösung geleitet, um überschüssigen HCl zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und es konnte ein beiger Feststoff erhalten werden. Dieser wurde in 5 mL Wasser gelöst und mit Natriumhydrogencarbonat (213 mg, 2.54 mmol, 2.00 eq) versetzt. Anschließend wurde eine Lösung aus Fmoc-OSu (428 mg, 1.27 mmol, 1.00 eq) in 5 mL Aceton langsam hinzugegeben. Nach 5 h Reaktionszeit zeigte die Dünnschichtchromatographie vollständigen Umsatz und die Mischung wurde auf pH=2 gebracht. Der entstehende Feststoff wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde mit Ethylacetat extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (DCM:MeOH:AcOH 20:1:0.05) lieferte Fmoc- ζ -Methyl-L-Phenylalanin (**34**, 322 mg, 0.80 mmol, 63%) als farbloser Feststoff.

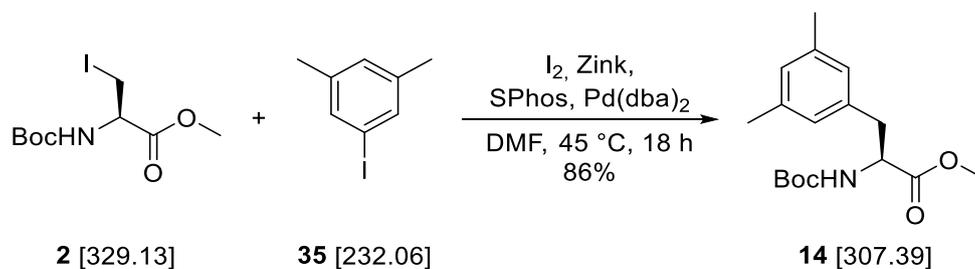
¹H-NMR: 500 MHz, DMSO_{d6}, δ = 7.88 (d, 3J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.67 (d, 3J = 8.6 Hz, 1H, NH), 7.64 (t, 3J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.41 (dt, 3J = 7.5, 2.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.31 (dt, 3J = 7.5 Hz, 4J = 1.0 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.28 (dt, 3J = 7.5 Hz, 2J = 1.0 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.15 (d, 3J = 8.0 Hz, 2H, H₂), 7.07 (d, 3J = 8.0 Hz, 2H, H₃), 4.22-4.11 (m, 4H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH, H α), 3.03 (dd, 2J = 14.0 Hz, 3J = 4.6 Hz, 1H, H β), 2.83 (dd, 2J = 14.0 Hz, 3J = 10.3 Hz, 1H, H β), 2.25 (s, 3H, ζ -CH₃).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 173.3 (COOH), 155.9 (Fmoc-CO), 143.7, 140.7 (Fmoc-C_{arom}), 135.3 (C₄), 134.8 (C₁), 128.9 (C₂), 128.7 (C₃), 127.6, 127.0, 125.2, 121.0 (Fmoc-CH_{arom}), 65.6 (Fmoc-CH₂), 55.6 (C α), 46.6 (Fmoc-CH), 36.1 (C β), 20.6 (CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₂₅H₂₃NO₄Na] [M+Na]⁺: 424.1519, gef.: 424.1524.

DC: R_f = 0.40 (DCM:MeOH:AcOH 20:1:0.05)

Synthese von Boc-L-Xmε-OMe



Aktiviertes Zink (297 mg, 4.56 mmol, 3.00 eq) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben gegeben und mit 3 mL DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Iod (57 mg, 0.23 mmol, 0.15 eq). Nach 5 min wurde erneut Iod (57 mg, 0.23 mmol, 0.15 eq) und Boc-Iodalanin-Methylester (**2**, 500 mg, 1.52 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben, woraufhin eine exotherme Reaktion einsetzte. Nach vollständiger Insertion des Zinks (30 min) wurden Pd(dba)₂ (87 mg, 0.15 mmol, 0.10 eq), SPhos (62 mg, 0.15 mmol, 0.10 eq) und 1-Iodo-3,5-dimethylbenzen (**35**, 458 mg, 1.97 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 45 °C für 18 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit Ethylacetat verdünnt und über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser und *brine* gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatografisch gereinigt, zunächst mit Toluol (1.5 L) und anschließend mit Toluol:Ethylacetat 19:1 und es wurden 400 mg (1.30 mmol, 86%) von Boc-L-Xmε-OMe **14** als braunes Öl erhalten.

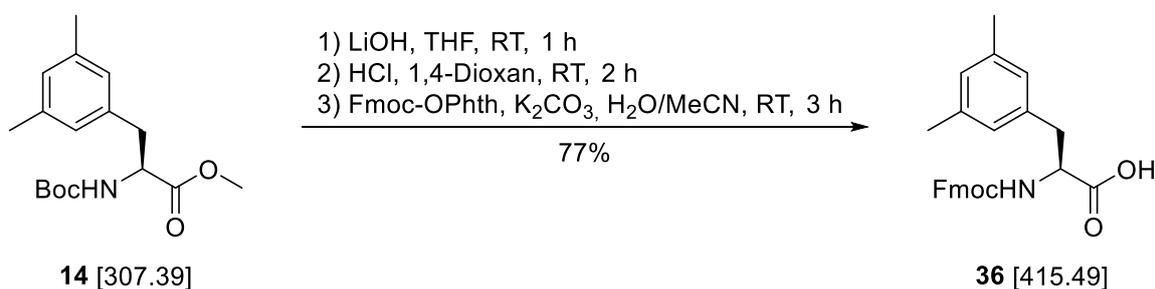
¹H-NMR: 500 MHz, DMSO_{d6}, δ = 7.24 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, NH), 6.83 (s, 1H, H_ζ), 6.81 (s, 2H, H_δ), 4.13 (ddd, ³J = 9.9, 8.0, 5.1 Hz, 1H, H_α), 3.60 (s, 3H, OMe), 2.90 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 5.1 Hz, 1H, H_β), 2.77 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 9.9 Hz, 1H, H_β), 2.22 (s, 6H, ε-CH₃), 1.33 (s, 9H, Boc).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 172.6 (COOMe), 155.3 (Boc-CO), 137.4 (C₁), 137.0 (C₃), 127.8 (C₄), 126.7 (C₂), 78.2 (C(CH₃)₃), 55.2 (C_α), 51.7 (OMe), 36.3 (C_β), 28.1 (C(CH₃)₃), 20.8 (C₃-CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₁₇H₂₆NO₄] [M+H]⁺: 308.1856, gef.: 308.1861.

DC: *R_f* = 0.26 (Toluol:Ethylacetat 19:1)

Synthese von Fmoc-L-Xmε



Das Phenylalaninderivat **14** (390 mg, 1.27 mmol, 1.00 eq) wurde in 6.3 mL THF gelöst und mit Lithiumhydroxid (1M in Wasser, 6.3 mL, 6.30 mmol, 5.00 eq) versetzt. Nach 1 h rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 2M Salzsäure auf pH=2 gebracht und mit Ethylacetat (3x) extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe von HCl in 1,4-Dioxan (4M, 2.0 mL, 8.00 mmol, 6.30 eq). Nach 2 h wurde Argon durch die Reaktionslösung geleitet, um überschüssigen HCl zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und es konnte ein beiger Feststoff erhalten werden. Dieser wurde in 7 mL Wasser gelöst und mit Kaliumcarbonat (431 mg, 3.13 mmol, 2.50 eq) versetzt. Anschließend wurde eine Lösung aus Fmoc-Ophth (770 mg, 2.00 mmol, 1.60 eq) in 7 mL Acetonitril langsam hinzugegeben. Eine Dünnschichtchromatographie zeigte vollständigen Umsatz und die Mischung wurde auf pH=2 gebracht. Es wurde mit Ethylacetat extrahiert (3x) und über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung erfolgte zunächst mit Toluol:Aceton 7:3, bis Anthranilsäure als orange Bande eluierte, worauf 0.05 Anteile Essigsäure hinzugegeben wurde um die Elution des Produkts zu begünstigen. Es wurde Fmoc- ϵ -dimethyl-L-Phenylalanin (**36**, 400 mg, 0.96 mmol, 77%) als beiger Feststoff erhalten.

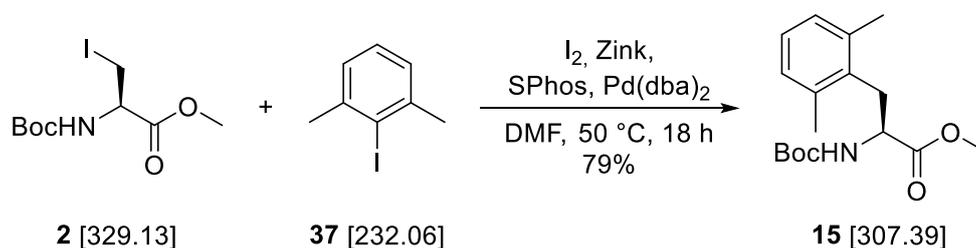
¹H-NMR: 500 MHz, DMSO_{d6}, δ = 12.70 (s, 1H, COOH), 7.88 (d, 3J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.69 (d, 3J = 8.5 Hz, 1H, NH), 7.67 (d, 3J = 7.6 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.65 (d, 3J = 7.6 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.41 (dt, 3J = 7.3, 2.0 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.30 (dt, 3J = 7.4 Hz, 4J = 1.0 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.27 (dt, 3J = 7.4 Hz, 4J = 1.0 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 6.87 (s, 2H, H δ), 6.82 (s, 1H, H ζ), 4.22-4.11 (m, 4H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH, H α), 2.99 (dd, 2J = 13.7 Hz, 3J = 4.4 Hz, 1H, H β), 2.79 (dd, 2J = 13.7 Hz, 3J = 10.4 Hz, 1H, H β), 2.21 (s, 6H, ϵ -CH₃).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 173.3 (COOH), 155.9 (Fmoc-CO), 143.7, 140.6 (Fmoc-C_{arom}), 137.8 (C1), 136.9 (C3), 127.8 (C4), 127.6, 127.0 (Fmoc-CH_{arom}), 127.0 (C2), 125.2, 120.0 (Fmoc-CH_{arom}), 65.6 (Fmoc-CH₂), 55.5 (C α), 46.5 (Fmoc-CH), 36.4 (C β), 20.9 (CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₂₆H₂₅NO₄Na] [M+Na]⁺: 438.1676, gef.: 438.1680.

DC: R_f = 0.27 (Toluol:Aceton:AcOH 7:3:0.05)

Darstellung von Boc-L-Xm δ -OMe



Aktiviertes Zink (417 mg, 6.38 mmol, 3.00 eq) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben gegeben und mit 3 mL DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Iod (81 mg, 0.32 mmol, 0.15 eq). Nach 5 min wurde erneut Iod (81 mg, 0.32 mmol, 0.15 eq) und Boc-Iodalanin-Methylester (**2**, 700 mg, 2.13 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben, woraufhin eine exotherme Reaktion einsetzte. Nach vollständiger Insertion des Zinks (30 min) wurden Pd(dba)₂ (122 mg, 0.21 mmol, 0.10 eq), Sphos (87 mg, 0.21 mmol, 0.10 eq) und 1-Iodo-2,6-dimethylbenzen (**37**, 641 mg, 2.77 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 50 °C für 18 h gerührt. Die Reaktion wurde mit Ethylacetat verdünnt und über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser und *brine* gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Toluol:Aceton 19:1), wodurch 518 mg (1.69 mmol, 79%) des von Boc- δ -dimethyl-L-Phenylalanin **15** als braunes Öl erhalten.

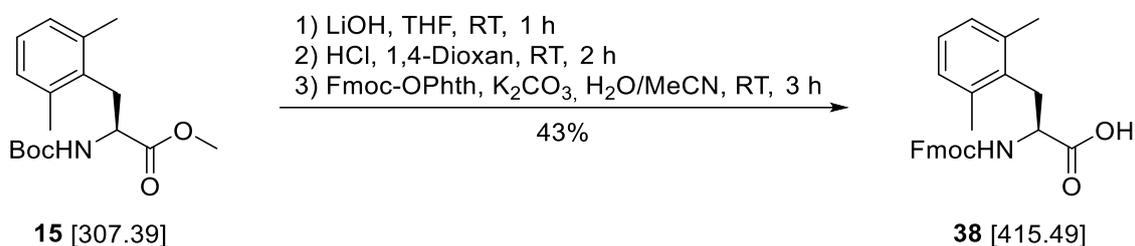
¹H-NMR: 300 MHz, DMSO_{d6}, δ = 7.37 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, NH), 6.99-6.95 (m, 3H, H ϵ , H ζ), 4.14 (q, ³J = 8.2 Hz, 1H, H α), 3.52 (s, 3H, OMe), 3.07 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 7.2 Hz, 1H, H β), 2.94 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 8.3 Hz, 1H, H β), 2.25 (s, 6H, δ -CH₃), 1.32 (s, 9H, Boc).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 172.6 (COOMe), 155.2 (Boc-CO), 136.6 (C γ), 134.3 (C δ), 127.9 (C ϵ), 126.1 (C ζ), 78.2 (C(CH₃)₃), 53.3 (C α), 51.6 (OMe), 31.0 (C β), 28.1 (C(CH₃)₃), 19.6 (C2-CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₁₇H₂₆NO₄Na] [M+Na]⁺: 330.1676, gef.: 330.1677.

DC: R_f = 0.25 (Toluol:Ethylacetat 19:1)

Synthese von Fmoc-L-Xm δ



Boc- δ -dimethyl-L-Phenylalanin **15** (1.00 g, 3.25 mmol, 1.00 eq) wurde in 13.0 mL THF gelöst und mit Lithiumhydroxid (1M in Wasser, 13.0 mL, 13.0 mmol, 4.00 eq) versetzt. Nach 1 h rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 2M Salzsäure auf pH=2 gebracht und mit Ethylacetat (3x) extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe von HCl in 1,4-Dioxan (4M, 5.0 mL, 20.0 mmol, 6.15 eq). Nach 2 h wurde Argon durch die Reaktionslösung geleitet, um überschüssigen HCl zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und es konnte ein beiger Feststoff erhalten werden. Dieser wurde in 15 mL Wasser gelöst und mit Kaliumcarbonat (1.20 g, 8.70 mmol, 2.68 eq) versetzt. Anschließend wurde eine Lösung aus Fmoc-OPht (2.15 g, 5.57 mmol,

1.71 eq) in 15 mL Acetonitril langsam hinzugegeben. Nach 3 h wurde die Mischung auf pH=2 eingestellt. Es wurde mit Ethylacetat extrahiert (3x) und über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung erfolgte zunächst mit Toluol:Ethylacetat 7:3, bis Anthranilsäure als orange Bande eluierte, worauf 0.05 Anteile Essigsäure hinzugegeben wurde um die Elution des Produkts zu fördern. Es wurde Fmoc- δ -dimethyl-L-Phenylalanin (**38**, 580 mg, 1.40 mmol, 43%) als farbloser Feststoff erhalten.

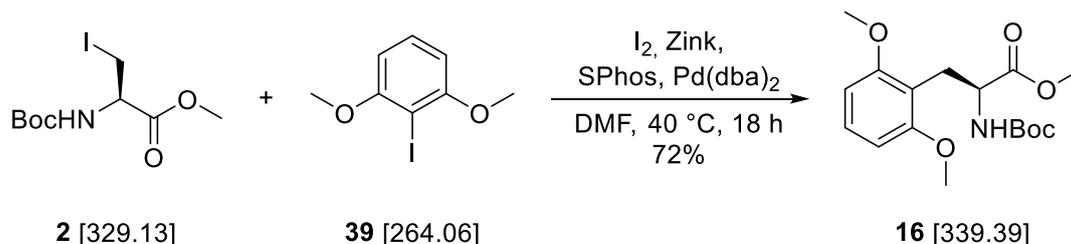
¹H-NMR: 500 MHz, DMSO_{d6}, δ = 7.88 (d, 3J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.66 (m 3H, NH, Fmoc-CH_{arom}), 7.41 (dt, 3J = 7.3, 3.7 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.34-7.28 (m, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 6.96-6.93 (m, 3H, H ζ , H ϵ), 4.19-4.11 (m, 4H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH, H α), 3.12 (dd, 2J = 14.0 Hz, 3J = 5.6 Hz, 1H, H β), 2.94 (dd, 2J = 14.0 Hz, 3J = 8.9 Hz, 1H, H β), 2.30 (s, 6H, δ -CH₃).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 173.8 (COOH), 155.8 (Fmoc-CO), 143.7, 140.6 (Fmoc-C_{arom}), 136.7 (C γ), 128.8, 128.2 (Fmoc-CH_{arom}), 127.9 (C δ), 127.6 (C ζ), 126.9 (C ϵ), 126.0, 125.3, 125.2, 120.0 (Fmoc-CH_{arom}), 65.6 (Fmoc-CH₂), 54.2 (C α), 46.6 (Fmoc-CH), 31.5 (C β), 19.9 (CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₂₆H₂₅NO₄Na] [M+Na]⁺: 438.1676, gef.: 438.1677.

DC: R_f = 0.12 (Toluol:Aceton 1:1)

Darstellung von Boc-L-Xa δ -OMe



Aktiviertes Zink (297 mg, 4.56 mmol, 3.00 eq) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben gegeben und mit 3 mL DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Iod (57 mg, 0.23 mmol, 0.15 eq). Nach 5 min wurde erneut Iod (57 mg, 0.23 mmol, 0.15 eq) und Boc-Iodalanin-Methylester (**2**, 500 mg, 1.52 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben, woraufhin eine exotherme Reaktion einsetzte. Nach vollständiger Insertion des Zinks (30 min) wurden Pd(dba)₂ (87 mg, 0.15 mmol, 0.10 eq), SPhos (62 mg, 0.15 mmol, 0.10 eq) und 1-Iodo-2,6-dimethoxybenzen (**39**, 522 mg, 1.97 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 40 °C für 18 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit Ethylacetat verdünnt und über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser und *brine* gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatografisch gereinigt, zunächst mit Dichlormethan (1.5 L) und anschließend mit Dichlormethan:Methanol 60:1 und es wurden 375 mg (1.11 mmol, 72%) Boc- δ -dimethoxy-L-Phenylalaninmethylester **16** als braunes Öl erhalten.

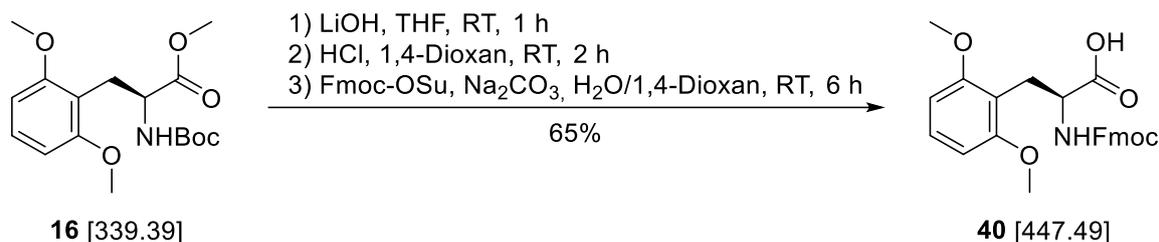
¹H-NMR: 300 MHz, DMSO_{d6}, δ = 7.17 (t, ³J = 8.4 Hz, 1H, H_ζ), 6.91 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, NH), 6.60 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, H_ε), 4.00 (q, ³J = 7.9 Hz, 1H, H_α), 3.74 (s, 6H, δ-OCH₃), 3.47 (s, 3H, OMe), 2.97 (dd, ²J = 13.0 Hz, ³J = 8.5 Hz, 1H, H_β), 2.83 (dd, ²J = 13.0 Hz, ³J = 7.0 Hz, 1H, H_β), 1.33 (s, 9H, Boc).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 172.5 (COOMe), 158.1 (C_δ), 155.0 (Boc-CO), 128.0 (C_ζ), 112.5 (C_γ), 103.7 (C_ε), 78.1 (C(CH₃)₃), 55.6 (C_δ-OCH₃), 53.2 (C_α), 51.3 (OMe), 28.1 (C(CH₃)₃), 24.7 (C_β).

HRMS (ESI+): ber. für [C₁₇H₂₅NO₆Na] [M+Na]⁺: 362.1574, gef.: 362.1574.

DC: R_f = 0.30 (DCM:Methanol 60:1)

Synthese von Fmoc-L-Xa_δ



Boc- δ -dimethoxy-L-Phenylalaninmethylester **16** (360 mg, 1.06 mmol, 1.00 eq) wurde in 6.0 mL THF gelöst und mit Lithiumhydroxid (1M in Wasser, 6.0 mL, 6.0 mmol, 5.66 eq) versetzt. Nach 1 h rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 2M Salzsäure auf pH=2 gebracht und mit Ethylacetat (3x) extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde HCl in 1,4-Dioxan (4M, 2.00 mL, 8.00 mmol, 7.55 eq). Nach 2 h wurde Argon durch die Reaktionslösung geleitet, um überschüssigen HCl zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und es konnte ein beiger Feststoff erhalten werden. Dieser wurde in 7 mL Wasser gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit Natriumcarbonat (560 mg, 5.27 mmol, 5.00 eq) versetzt. Anschließend wurde eine Lösung aus Fmoc-OSu (349 mg, 1.03 mmol, 0.98 eq) in 7 mL 1,4-Dioxan langsam hinzugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionslösung für 6 h gerührt. Die Mischung wurde auf pH=2 eingestellt, mit Ethylacetat extrahiert (3x) und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration der Suspension wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (Dichlormethan:Methanol:Essigsäure 20:1:0.05) lieferte Fmoc- δ -dimethoxy-L-Phenylalanin (**40**, 310 mg, 0.69 mmol, 65%) als farbloser Feststoff.

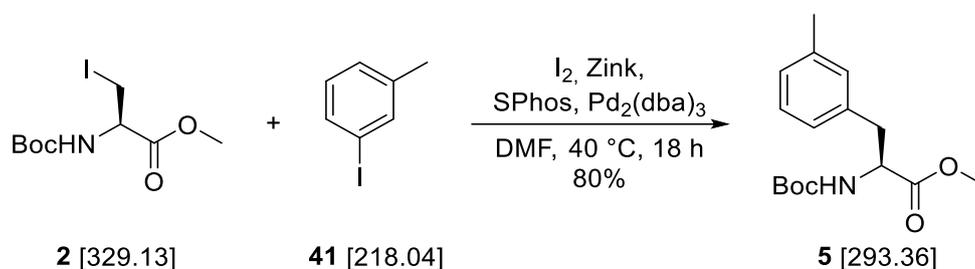
¹H-NMR: 300 MHz, DMSO_{d6}, δ = 7.88 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.65 (m 2H, NH, Fmoc-CH_{arom}), 7.41 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.31 (q, ³J = 7.3 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.19 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, H_ζ), 7.17 (t, ³J = 8.4 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 6.61 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, H_ε), 4.20-4.15 (m, 3H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH), 4.08 (q, ³J = 7.3 Hz, H_α), 3.74 (s, 6H, δ-OCH₃), 3.07 (dd, ²J = 13.0 Hz, ³J = 6.8 Hz, 1H, H_β), 2.94 (dd, ²J = 13.0 Hz, ³J = 8.7 Hz, 1H, H_β).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 173.8 (COOH), 158.2 (Cδ), 155.8 (Fmoc-CO), 143.8, 143.7, 140.6 (Fmoc-C_{arom}), 127.9 (Cζ), 127.6, 127.0 125.2, 120.1 (Fmoc-CH_{arom}), 113.2 (Cγ), 103.9 (Cε), 65.7 (Fmoc-CH₂), 55.7 (Cδ-OCH₃), 53.5 (Cα), 46.5 (Fmoc-CH), 24.7 (Cβ).

HRMS (ESI+): ber. für [C₂₆H₂₅NO₆Na] [M+Na]⁺: 470.1574, gef.: 470.1574.

DC: R_f = 0.35 (DCM:Methanol:AcOH 20:1:0.05)

Darstellung von Boc-L-Fmε-OMe



Aktiviertes Zink (418 mg, 6.39 mmol, 3.00 eq) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben gegeben und mit 3 mL DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Iod (81 mg, 0.32 mmol, 0.15 eq). Nach 5 min wurde erneut Iod (81 mg, 0.32 mmol, 0.15 eq) und Boc-Iodalanin-Methylester (**2**, 700 mg, 2.13 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben, woraufhin eine exotherme Reaktion einsetzte. Nach vollständiger Insertion des Zinks (30 min) wurden Pd₂(dba)₃ (107 mg, 0.11 mmol, 0.05 eq), SPhos (87 mg, 0.21 mmol, 0.10 eq) und 1-Iodo-3-methylbenzen (**41**, 603 mg, 2.77 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 40 °C für 18 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit Ethylacetat verdünnt und über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser und *brine* gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatografisch gereinigt (Toluol:Ethylacetat 19:1) und lieferte 499 mg (1.70 mmol, 80%) Boc-ε-methyl-L-Phenylalanin-methylester **5** als brauner Feststoff.

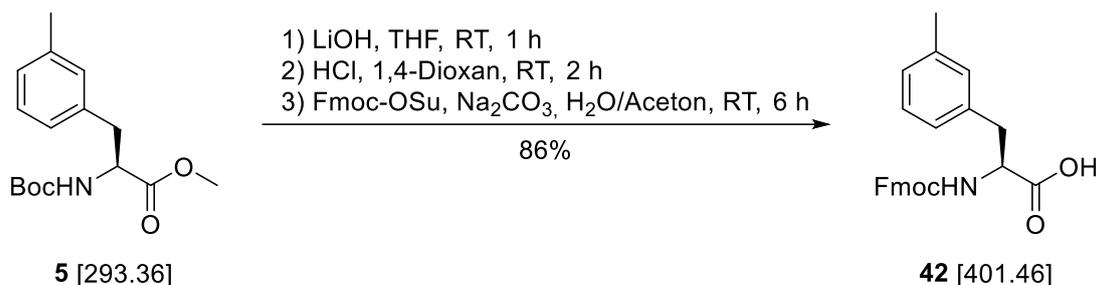
¹H-NMR: 300 MHz, DMSO_{d6}, δ = 7.27 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, NH), 7.16 (t, ³J = 7.5 Hz, 1H, Hε'), 7.05-6.99 (m, 3H, Hδ, Hδ', Hζ), 4.15 (ddd, ³J = 9.7, 8.2, 5.0 Hz, 1H, Hα), 3.60 (s, 3H, OMe), 2.94 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 5.1 Hz, 1H, Hβ), 2.80 (dd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 10.0 Hz, 1H, Hβ), 2.27 (s, 3H, ε-CH₃), 1.33 (s, 9H, Boc).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 172.5 (COOMe), 155.3 (Boc-CO), 137.4 (Cγ), 137.1 (Cε), 129.6 (Cδ), 128.0 (Cε'), 127.0 (Cζ), 126.1 (Cδ'), 78.2 (C(CH₃)₃), 55.1 (Cα), 51.7 (OMe), 36.4 (Cβ), 28.1 (C(CH₃)₃), 20.9 (Cε-CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₁₆H₂₄NO₄] [M+H]⁺: 295.1733, gef.: 295.1727.

DC: R_f = 0.55 (Toluol:Ethylacetat 9:1)

Synthese von Fmoc-L-Fme



Boc- ϵ -methyl-L-Phenylalaninmethylester **5** (500 mg, 1.70 mmol, 1.00 eq) wurde in 8.5 mL THF gelöst und mit Lithiumhydroxid (1M in Wasser, 8.5 mL, 8.50 mmol, 5.00 eq) versetzt. Nach 1 h rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 2M Salzsäure auf pH=2 gebracht und mit Ethylacetat (3x) extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde HCl in 1,4-Dioxan (4M, 1.70 mL, 6.80 mmol, 4.00 eq). Nach 2 h wurde Argon durch die Reaktionslösung geleitet, um überschüssigen HCl zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und es konnte ein beiger Feststoff erhalten werden. Dieser wurde in 10 mL Wasser gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 10%iger Natriumcarbonatlösung der pH-Wert auf 9 eingestellt. Anschließend wurde eine Lösung aus Fmoc-OSu (613 mg, 1.82 mmol, 1.10 eq) in 10 mL Aceton langsam hinzugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionslösung für 6 h gerührt. Die Mischung wurde auf pH=2 eingestellt, mit Ethylacetat extrahiert (3x) und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration der Suspension wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufarbeitung (Dichlormethan:Methanol:Essigsäure 25:1:0.05) lieferte Fmoc- ϵ -methyl-L-Phenylalanin (**42**, 570 mg, 1.42 mmol, 86%) als farbloser Feststoff.

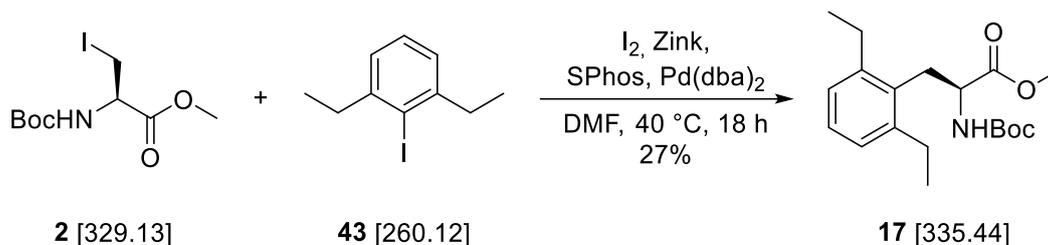
¹H-NMR: 300 MHz, DMSO_{d6}, δ = 12.72 (s, 1H, COOH), 7.88 (d, 3J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.71 (d, 3J = 8.5 Hz, 1H, NH), 7.66 (t, 3J = 6.9 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.41 (t, 3J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.30 (dq, 3J = 7.7 Hz, 4J = 1.0 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.16 (t, 3J = 7.7 Hz, 1H, H ϵ'), 7.07 (s, 1H, H δ), 7.03 (d, 3J = 6.2 Hz, 1H, H δ'), 7.01 (d, 3J = 7.6 Hz, 1H, H ζ), 4.23-4.10 (m, 4H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH, H α), 3.05 (dd, 2J = 13.8 Hz, 3J = 4.2 Hz, 1H, H β), 2.83 (dd, 2J = 13.8 Hz, 3J = 10.5 Hz, 1H, H β), 2.25 (s, 3H, ϵ -CH₃).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 173.5 (COOH), 155.8 (Fmoc-CO), 143.7, 140.7, 140.6 (Fmoc-C_{arom}), 138.0 (C γ), 137.1 (C ϵ), 129.7 (C δ), 128.0 (C ϵ'), 127.6, 127.0 (Fmoc-CH_{arom}), 126.9 (C ζ), 126.1 (C δ'), 125.3, 125.2, 120.0 (Fmoc-CH_{arom}), 65.6 (Fmoc-CH₂), 55.7 (C α), 46.6 (Fmoc-CH), 36.6 (C β), 21.0 (CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₂₅H₂₃NO₄Na] [M+Na]⁺: 424.1519, gef.: 424.1520.

DC: R_f = 0.55 (DCM:MeOH:AcOH 25:1:0.05)

Darstellung von Boc-L-Xeδ-OMe



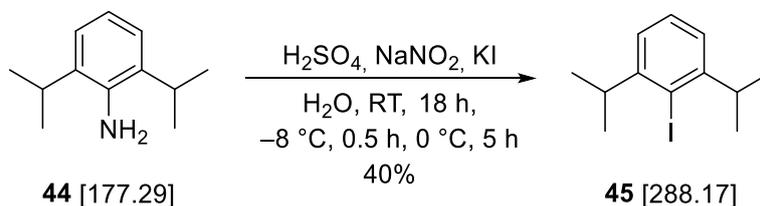
Aktiviertes Zink (477 mg, 7.29 mmol, 3.00 eq) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben gegeben und mit 3 mL DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Iod (93 mg, 0.37 mmol, 0.15 eq). Nach 5 min wurde erneut Iod (93 mg, 0.37 mmol, 0.15 eq) und Boc-Iodalanin-Methylester (**2**, 800 mg, 2.43 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben, woraufhin eine exotherme Reaktion einsetzte. Nach vollständiger Insertion des Zinks (30 min) wurden Pd₂(dba)₃ (111 mg, 0.12 mmol, 0.05 eq), SPhos (100 mg, 0.24 mmol, 0.10 eq) und 1-Iodo-2,6-diethylbenzen (**43**, 822 mg, 3.16 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 40 °C für 18 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit Ethylacetat verdünnt und über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser und *brine* gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatografisch gereinigt (Toluol:Ethylacetat 19:1) und lieferte 220mg (0.66 mmol, 27%) Boc-δ-diethyl-L-Phenylalanin-methylester **17** als brauner Feststoff.

¹H-NMR: 300 MHz, DMSO_{d6}, δ = 7.37 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, NH), 7.08 (t, ³J = 7.6 Hz, 1H, H_ζ), 7.00 (d, ³J = 7.3 Hz, 2H, H_ε), 4.07 (q, ³J = 7.7 Hz, 1H, H_α), 3.49 (s, 3H, OMe), 3.09 (dd, ²J = 14.3 Hz, ³J = 7.2 Hz, 1H, H_β), 2.95 (dd, ²J = 14.3 Hz, ³J = 8.0 Hz, 1H, H_β), 2.59 (q, ³J = 7.4 Hz, 4H, δ-CH₂), 1.33 (s, 9H, Boc), 1.13 (t, ³J = 7.5 Hz, 6H, δ-CH₂-CH₃).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 172.5 (COOMe), 155.2 (Boc-CO), 142.7 (C_δ), 132.6 (C_γ), 126.6 (C_ζ), 126.0 (C_ε), 78.2 (C(CH₃)₃), 54.5 (C_α), 51.6 (OMe), 29.4 (C_β), 28.1 (C(CH₃)₃), 25.1 (C_δ-CH₂), 15.6 (C_δ-CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₁₉H₂₉NO₄Na] [M+Na]⁺: 359.2033, gef.: 359.2033.

DC: R_f = 0.31 (Toluol:Ethylacetat 19:1)

 Darstellung von 2,6-Di-*iso*-Propyl-Iodbenzol


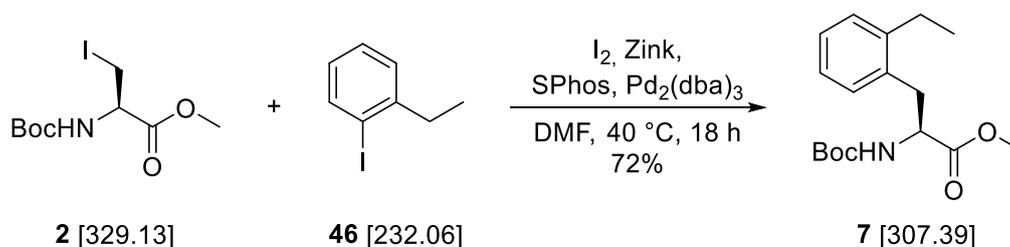
2,6-Diisopropylanilin (4.50 g, 25.4 mmol, 1.00 eq) wurde zu einer Lösung aus 250 mL Wasser und 28 mL konz. Schwefelsäure gegeben und 18 h gerührt. Die entstehende Suspension wurde auf $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und anschließend eine Lösung aus Natriumnitrit (2.10 g, 30.5 mmol, 1.20 eq) in 15 mL Wasser tropfenweise hinzugegeben. Nach 0.5 h Reaktionszeit wurde Kaliumiodid (5.60 g, 33.8 mmol, 1.33 eq) in 15 mL Wasser in einer Portion hinzugegeben. Nach 5 h wurde keine Gasentwicklung mehr beobachtet und die wässrige Phase mit Diethylether (2x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 20% Natriumthiosulfat (2x), Wasser und *brine* gewaschen und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (Pentan) lieferte 1-Iodo-2,6-Di-*iso*-Propyl-benzen (2.96 g, 10.3 mmol, 40%) als farblose Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, CDCl_3 , $\delta = 7.33$ (t, $^3J = 7.2$ Hz, 1H, H4), 7.17 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 2H, H3), 3.51 (sept, $^3J = 6.7$ Hz, 2H, *iPr-CH*), 1.33 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 12H, *iPr-CH*₃).

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, CDCl_3 , $\delta = 151.26$ (C2), 128.5 (C4), 123.9 (C3), 109.3 (C1), 39.6 (*iPr-CH*), 23.5 (*iPr-CH*₃).

DC: $R_f = 0.75$ (Pentan)

Synthese von Boc-L-Fe δ -OMe



Aktiviertes Zink (477 mg, 7.29 mmol, 3.00 eq) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben gegeben und mit 3 mL DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Iod (93 mg, 0.36 mmol, 0.15 eq). Nach 5 min wurde erneut Iod (93 mg, 0.36 mmol, 0.15 eq) und Boc-Iodalanin-Methylester (**2**, 800 mg, 2.43 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben, woraufhin eine exotherme Reaktion einsetzte. Nach vollständiger Insertion des Zinks (30 min) wurden Pd₂(dba)₃ (111 mg, 0.12 mmol, 0.05 eq), SPhos (100 mg, 0.24 mmol, 0.10 eq) und 1-Iodo-2-ethylbenzen (**46**, 733 mg, 3.16 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 40 °C für 18 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit Ethylacetat verdünnt und über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser und *brine* gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatografisch gereinigt (Toluol:Ethylacetat 19:1) und lieferte 540 mg (1.76 mmol, 72%) Boc- δ -ethyl-L-Phenylalanin-methylester **7** als brauner Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, DMSO-d_6 , $\delta = 7.34$ (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1H, NH), 7.20-7.05 (m, 4H, H δ' , H ϵ' , H ϵ , H ζ), 4.15 (dt, $^3J = 9.2, 5.2$ Hz, 1H, H α), 3.60 (s, 3H, OMe), 3.04 (dd, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, 1H, H β),

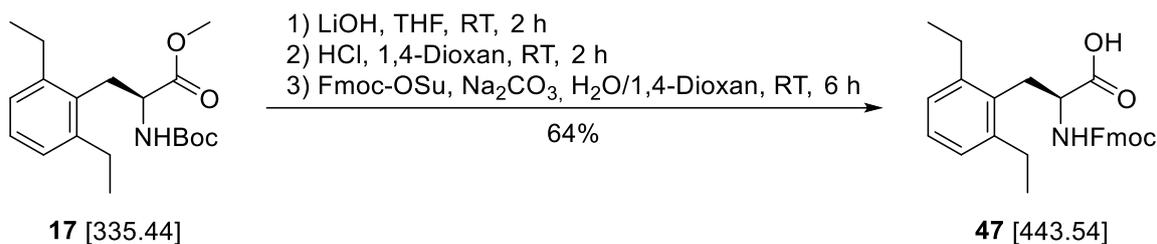
2.86 (dd, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 9.8$ Hz, 1H, H β), 2.62 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, δ -CH $_2$), 1.32 (s, 9H, Boc), 1.16 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 3H, δ -CH $_2$ -CH $_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, DMSO $_d6$, $\delta = 172.6$ (COOMe), 155.3 (Boc-CO), 141.9 (C δ), 134.9 (C γ), 129.8 (C ϵ), 128.2 (C δ'), 126.7 (C ζ), 125.4 (C ϵ') 78.2 (C(CH $_3$) $_3$), 54.5 (C α), 51.7 (OMe), 33.3 (C β), 28.1 (C(CH $_3$) $_3$), 24.6 (C δ -CH $_2$) 15.1 (C δ -CH $_2$ -CH $_3$).

HRMS (ESI $^+$): ber. für [C $_{17}$ H $_{25}$ NO $_4$ Na] [M+Na] $^+$: 330.1676, gef.: 330.1684.

DC: $R_f = 0.63$ (Toluol:Ethylacetat 9:1)

Darstellung von Fmoc-L-Xe δ



Boc- δ -diethyl-L-Phenylalaninmethylester **17** (222 mg, 0.63 mmol, 1.00 eq) wurde in 4.0 mL THF gelöst und mit Lithiumhydroxid (1M in Wasser, 3.2 mL, 3.20 mmol, 5.08 eq) versetzt. Nach 2 h rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 2M Salzsäure auf pH=2 gebracht und mit Ethylacetat (3x) extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde HCl in 1,4-Dioxan (4M, 1.00 mL, 4.00 mmol, 6.35 eq). Nach 2 h wurde Argon durch die Reaktionslösung geleitet, um überschüssigen HCl zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und es konnte ein beiger Feststoff erhalten werden. Dieser wurde in 5.00 mL Wasser gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 10%iger Natriumcarbonatlösung der pH-Wert auf 9 eingestellt. Anschließend wurde eine Lösung aus Fmoc-OSu (230 mg, 0.69 mmol, 1.10 eq) in 5.00 mL Aceton langsam hinzugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionslösung für 6 h gerührt. Die Mischung wurde auf pH=2 eingestellt, mit Ethylacetat extrahiert (3x) und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration der Suspension wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufarbeitung (Dichlormethan:Methanol:Essigsäure 25:1:0.05) lieferte Fmoc- δ -diethyl-L-Phenylalanin **47** (179 mg, 0.40 mmol, 64%) als farbloser Feststoff.

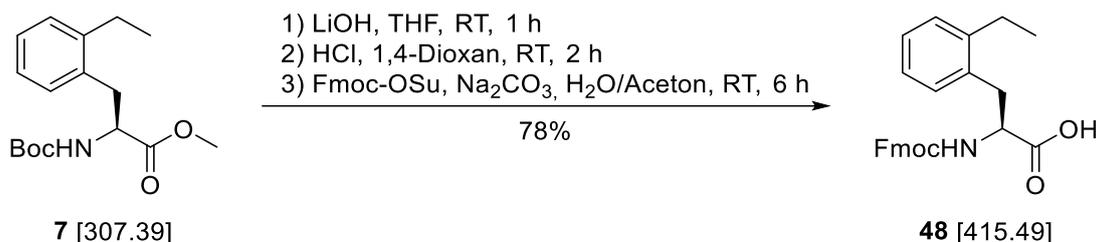
$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, DMSO $_d6$, $\delta = 7.89$ (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc-CH $_{\text{arom}}$), 7.78 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1H, NH), 7.68 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, Fmoc-CH $_{\text{arom}}$), 7.41 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, Fmoc-CH $_{\text{arom}}$), 7.32 (q, $^3J = 7.0$ Hz, 2H, Fmoc-CH $_{\text{arom}}$), 7.08 (dd, $^3J = 8.4, 6.6$ Hz, 1H, H ζ), 6.99 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 2H, H ϵ), 4.23-4.07 (m, 4H, Fmoc-CH $_2$, Fmoc-CH, H α), 3.17 (dd, $^2J = 14.2$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, 1H, H β), 2.97 (dd, $^2J = 14.2$ Hz, $^3J = 8.8$ Hz, 1H, H β), 2.74-2.62 (m, 4H, δ -CH $_2$), 1.13 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 6H, δ -CH $_2$ -CH $_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, DMSO-d_6 , $\delta = 173.5$ (COOH), 155.9 (Fmoc-CO), 143.8, 143.7 (Fmoc-C_{arom}), 142.8 (C δ), 140.6 (Fmoc-C_{arom}), 133.2 (C γ), 127.6, 127.0 (Fmoc-CH_{arom}), 126.5 (C ζ), 126.0 (C ϵ), 125.2, 120.1 (Fmoc-CH_{arom}), 65.6 (Fmoc-CH₂), 55.2 (C α), 46.5 (Fmoc-CH), 29.8 (C β) 25.2 (C δ -CH₂), 15.6 (C δ -CH₂-CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für $[\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{NO}_4\text{Na}] [\text{M}+\text{Na}]^+$: 466.1989, gef.: 466.2001.

DC: $R_f = 0.55$ (DCM:MeOH:AcOH 25:1:0.05)

Synthese von Fmoc-L-Fe δ



Boc- δ -ethyl-L-Phenylalaninmethylester **7** (530 mg, 1.72 mmol, 1.00 eq) wurde in 8.7 mL THF gelöst und mit Lithiumhydroxid (1M in Wasser, 8.7 mL, 8.70 mmol, 5.06 eq) versetzt. Nach 1 h rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 2M Salzsäure auf pH=2 gebracht und mit Ethylacetat (3x) extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde HCl in 1,4-Dioxan (4M, 2.50 mL, 10.0 mmol, 5.81 eq). Nach 2 h wurde Argon durch die Reaktionslösung geleitet, um überschüssigen HCl zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und es konnte ein beiger Feststoff erhalten werden. Dieser wurde in 15.0 mL Wasser gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 10%iger Natriumcarbonatlösung der pH-Wert auf 9 eingestellt. Anschließend wurde eine Lösung aus Fmoc-OSu (617 mg, 1.83 mmol, 1.06 eq) in 15.0 mL Aceton langsam hinzugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionslösung für 6 h gerührt. Die Mischung wurde auf pH=2 eingestellt, mit Ethylacetat extrahiert (3x) und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration der Suspension wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufarbeitung (Dichlormethan:Methanol:Essigsäure 25:1:0.05) lieferte Fmoc- δ -ethyl-L-Phenylalanin **48** (557 mg, 1.34 mmol, 78%) als leicht-gelber Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, DMSO-d_6 , $\delta = 12.71$ (s, 1H, COOH), 7.88 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.79 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1H, NH), 7.66 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.40 (dt, $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.30 (q, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.25-7.05 (m, 4H, H δ' , H ϵ , H ϵ' , H ζ), 4.23-4.10 (m, 4H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH, H α), 3.16 (dd, $^2J = 14.2$ Hz, $^3J = 4.2$ Hz, 1H, H β), 2.87 (dd, $^2J = 14.2$ Hz, $^3J = 10.6$ Hz, 1H, H β), 2.66 (q, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, δ -CH₂), 1.17 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 3H, δ -CH₂-CH₃).

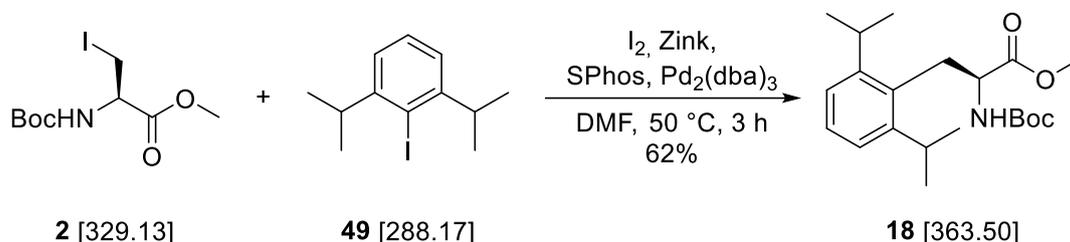
$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, DMSO-d_6 , $\delta = 173.4$ (COOH), 155.9 (Fmoc-CO), 143.7 (Fmoc-C_{arom}), 141.9 (C δ), 140.6 (Fmoc-C_{arom}), 135.3 (C γ), 129.8 (Fmoc-CH_{arom}), 128.2 (C ϵ), 127.6, 127.0 (Fmoc-CH_{arom}),

126.6 (C δ^*), 125.4 (C ζ), 125.2 (C ϵ^*), 125.2, 120.1 (Fmoc-CH_{arom}), 65.6 (Fmoc-CH₂), 54.8 (C α), 46.5 (Fmoc-CH), 33.4 (C β) 24.6 (C δ -CH₂), 15.2 (C δ -CH₂-CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₂₆H₂₅NO₄Na] [M+Na]⁺: 438.1676, gef.: 438.1685.

DC: $R_f = 0.50$ (DCM:MeOH:AcOH 25:1:0.05)

Synthese von Boc-L-Xi δ -OMe



Aktiviertes Zink (477 mg, 7.29 mmol, 3.00 eq) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben gegeben und mit 3 mL DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Iod (93 mg, 0.36 mmol, 0.15 eq). Nach 5 min wurde erneut Iod (93 mg, 0.36 mmol, 0.15 eq) und Boc-Iodalanin-Methylester (**2**, 800 mg, 2.43 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben, woraufhin eine exotherme Reaktion einsetzte. Nach vollständiger Insertion des Zinks (30 min) wurden Pd₂(dba)₃ (111 mg, 0.12 mmol, 0.05 eq), SPhos (100 mg, 0.24 mmol, 0.10 eq) und 1-Iodo-2,6-diisopropylbenzen (**49**, 911 mg, 3.16 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 50 °C für 3 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatografisch gereinigt (Toluol:Ethylacetat 19:1). Es wurde Boc- δ -di-*iso*-propyl-L-Phenylalanin-methylester **18** (546 mg, 1.50 mmol, 62%) als brauner Feststoff erhalten.

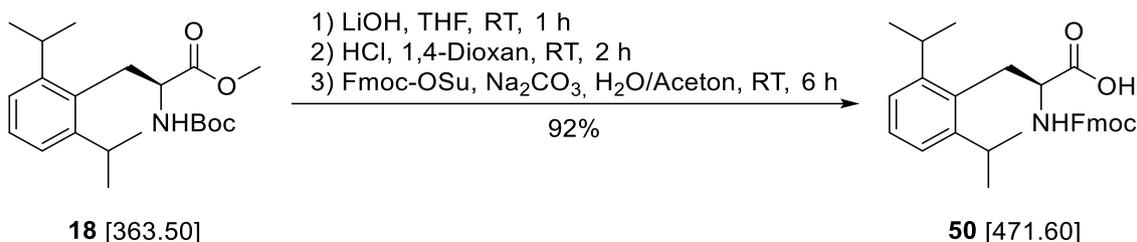
¹H-NMR: 300 MHz, DMSO_{d6}, $\delta = 7.35$ (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, NH), 7.16 (t, ³J = 7.5 Hz, 1H, H ζ), 7.08 (d, ³J = 7.0 Hz, 2H, H ϵ), 4.12-4.02 (m, 1H, H α), 3.50 (s, 3H, OMe), 3.21-3.10 (m, 3H, H β , δ -CH), 3.01 (dd, ²J = 14.4 Hz, ³J = 8.6 Hz, 1H, H β), 1.32 (s, 9H, Boc), 1.15 (dd, ³J = 6.7 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 12H, δ -CH-CH₃).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, $\delta = 172.3$ (COOMe), 155.2 (Boc-CO), 147.3 (C δ), 130.9 (C γ), 126.9 (C ζ), 122.6 (C ϵ), 78.2 (C(CH₃)₃), 55.0 (C α), 51.6 (OMe), 28.4 (C β), 28.0 (C(CH₃)₃), 24.3 (C δ -CH) 24.0 (C δ -CH-CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₂₁H₃₃NO₄Na] [M+Na]⁺: 386.2302, gef.: 386.2312.

DC: $R_f = 0.35$ (Toluol:Ethylacetat 19:1)

Synthese von Fmoc-L-Xið

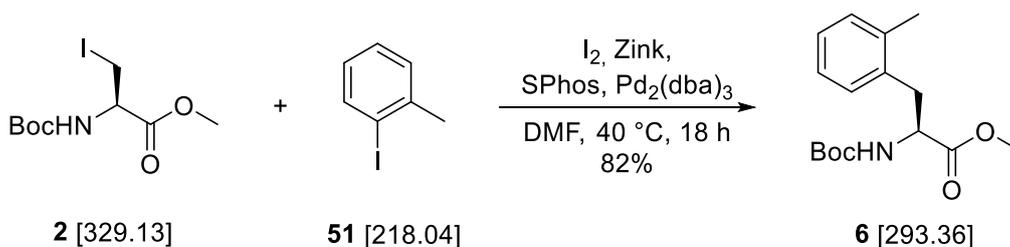


Boc- δ -diisopropyl-L-Phenylalaninmethylester **18** (504 mg, 1.39 mmol, 1.00 eq) wurde in 7.0 mL THF gelöst und mit Lithiumhydroxid (1M in Wasser, 7.0 mL, 7.00 mmol, 5.04 eq) versetzt. Nach 1 h rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 2M Salzsäure auf pH=2 gebracht und mit Ethylacetat (3x) extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde HCl in 1,4-Dioxan (4M, 2.50 mL, 10.0 mmol, 7.19 eq). Nach 2 h wurde Argon durch die Reaktionslösung geleitet, um überschüssigen HCl zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und es konnte ein beiger Feststoff erhalten werden. Dieser wurde in 12.0 mL Wasser gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit Fmoc-OSu (460 mg, 1.36 mmol, 0.98 eq) in 12.0 mL Aceton versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit 10%iger Natriumcarbonatlösung auf pH-Wert=9 eingestellt. Das Eisbad wurde entfernt und die Lösung für 6 h gerührt. Die Mischung wurde auf pH=2 eingestellt, mit Ethylacetat extrahiert (3x) und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration der Suspension wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufarbeitung (Dichlormethan:Methanol:Essigsäure 25:1:0.05) lieferte Fmoc- δ -diisopropyl-L-Phenylalanin **50** (603 mg, 1.28 mmol, 92%) als leicht-gelber Feststoff.

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO_{d6}, δ = 12.68 (s, 1H, COOH), 7.88 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.74 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, NH), 7.69 (dd, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.41 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.33-7.27 (m, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.15 (dd, ³J = 8.2, 7.0 Hz, 1H, H ζ), 7.08 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, H ϵ), 4.28-4.15 (m, 3H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH), 4.09 (dt, ³J = 8.8, 6.0 Hz, 1H, H α), 3.27 (q, ³J = 6.5 Hz, 2H, δ -CH-CH₃) 3.20 (dd, ²J = 14.5 Hz, ³J = 5.6 Hz, 1H, H β), 3.03 (dd, ²J = 14.3 Hz, ³J = 9.1 Hz, 1H, H β), 1.14 (t, ³J = 7.0 Hz, 12H, δ -CH-CH₃).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 173.3 (COOH), 156.0 (Fmoc-CO), 147.4 (C δ), 143.8, 143.7 (Fmoc-C_{arom}), 140.7 (Fmoc-C_{arom}), 131.4 (C γ), 127.6, 127.0, 126.9 (Fmoc-CH_{arom}), 126.9 (C ζ), 126.8, 125.3, 125.2 (Fmoc-CH_{arom}), 122.7 (C ϵ), 120.1 (Fmoc-CH_{arom}), 65.7 (Fmoc-CH₂), 55.6 (C α), 46.5 (Fmoc-CH), 29.0 (C β) 28.3 (C δ -CH-CH₃), 24.3, 24.2 (C δ -CH-CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₃₀H₃₃NO₄Na] [M+Na]⁺: 494.2302, gef.: 494.2315.

Darstellung von Boc-L-Fm δ -OMe


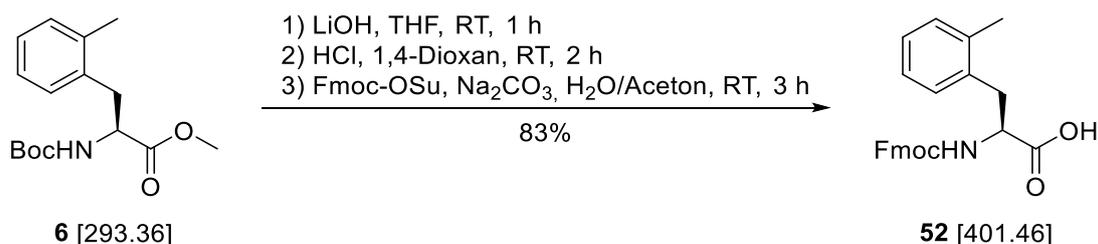
Aktiviertes Zink (418 mg, 6.39 mmol, 3.00 eq) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben gegeben und mit 3 mL DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Iod (81 mg, 0.32 mmol, 0.15 eq). Nach 5 min wurde erneut Iod (81 mg, 0.32 mmol, 0.15 eq) und Boc-Iodalanin-Methylester (**2**, 700 mg, 2.13 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben, woraufhin eine exotherme Reaktion einsetzte. Nach vollständiger Insertion des Zinks (30 min) wurden Pd₂(dba)₃ (97 mg, 0.11 mmol, 0.05 eq), SPhos (87 mg, 0.21 mmol, 0.10 eq) und 1-Iodo-2-methylbenzen (**51**, 603 mg, 2.77 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 40 °C für 18 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Toluol:Ethylacetat 19:1). Somit wurde Boc- δ -methyl-L-Phenylalanin-methylester **6** (514 mg, 1.75 mmol, 82%) als brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO_{d6}, δ = 7.32 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, NH), 7.16-7.07 (m, 4H, H δ ' , H ϵ , H ϵ ' , H ζ), 4.17 (dt, ³J = 9.7, 5.3 Hz, 1H, H α), 3.60 (s, 3H, OMe), 3.02 (dd, ²J = 14.0 Hz, ³J = 5.2 Hz, 1H, H β), 2.84 (dd, ²J = 14.0 Hz, ³J = 10.0 Hz, 1H, H β), 2.27 (s, 3H, δ -CH₃), 1.32 (s, 9H, Boc).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 172.6 (COOMe), 155.3 (Boc-CO), 136.0 (C δ), 135.7 (C γ), 130.0 (C ϵ), 129.6 (C δ '), 126.5 (C ζ), 125.6 (C ϵ '), 78.2 (C(CH₃)₃), 53.7 (C α), 51.7 (OMe), 34.0 (C β), 28.1 (C(CH₃)₃), 18.8 (C δ -CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₁₆H₂₃NO₄Na] [M+Na]⁺: 316.1519, gef.: 316.1530.

DC: R_f = 0.20 (Toluol:Ethylacetat 19:1)

 Synthese von Fmoc-L-Fm δ


Boc- δ -methyl-L-Phenylalaninmethylester **6** (680 mg, 2.32 mmol, 1.00 eq) wurde in 12.0 mL THF gelöst und mit Lithiumhydroxid (1M in Wasser, 12.0 mL, 12.0 mmol, 5.17 eq) versetzt. Nach 1 h rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 2M Salzsäure auf pH=2 gebracht und mit Ethylacetat (3x) extrahiert.

Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde HCl in 1,4-Dioxan (4M, 3.48 mL, 13.9 mmol, 6.00 eq). Nach 2 h wurde Argon durch die Reaktionslösung geleitet, um überschüssigen HCl zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und es konnte ein beiger Feststoff erhalten werden. Dieser Feststoff wurde in 25.0 mL Wasser gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit Fmoc-OSu (766 mg, 2.27 mmol, 0.98 eq) in 25.0 mL Aceton versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit 10%iger Natriumcarbonatlösung auf pH-Wert = 9 eingestellt. Das Eisbad wurde entfernt und die Lösung für 3 h gerührt. Die Mischung wurde auf pH = 2 eingestellt, mit Ethylacetat extrahiert (3x) und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration der Suspension wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 5:4, nach Elution der Verunreinigung wurden 0.05 Anteile Essigsäure hinzugegeben). Es wurde Fmoc- δ -methyl-L-Phenylalanin **52** (780 mg, 1.94 mmol, 83%) als blass-gelber Feststoff erhalten.

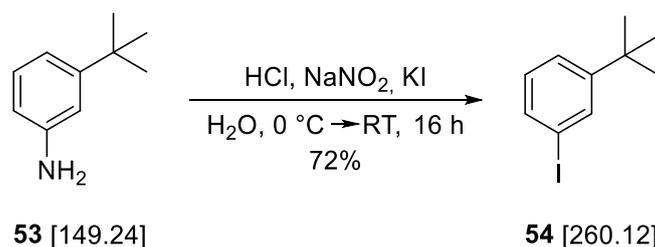
¹H-NMR: 600 MHz, DMSO_{d6}, δ = 12.78 (s, 1H, COOH), 7.88 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.78 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, NH), 7.66 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.64 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.41 (dt, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 4.2 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.32 (dt, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 0.8 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.29 (dt, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 0.8 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.21 (dd, ³J = 6.6 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 1H, H δ '), 7.14 (dd, ³J = 7.0 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, H ϵ), 7.10 (dt, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.7 Hz 1H, H ζ), 7.08 (dt, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 1H, H ϵ '), 4.22-4.10 (m, 4H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH, H α), 3.12 (dd, ²J = 14.2 Hz, ³J = 4.4 Hz, 1H, H β), 2.86 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 10.4 Hz, 1H, H β), 2.30 (s, 3H, δ -CH₃).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 173.4 (COOH), 155.9 (Fmoc-CO), 143.7, 140.6 (Fmoc-C_{arom}), 136.1 (C γ), 136.0 (C δ), 130.0 (C ϵ), 129.7 (C δ '), 127.6, 127.0 (Fmoc-CH_{arom}), 126.4 (C ϵ '), 125.5 (C ζ), 125.2, 125.2, 120.1 (Fmoc-CH_{arom}), 65.6 (Fmoc-CH₂), 54.1 (C α), 46.5 (Fmoc-CH), 34.0 (C β), 18.8 (C δ -CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₂₅H₂₃NO₄Na] [M+Na]⁺: 424.1519, gef.: 424.1543.

DC: R_f = 0.28 (Cyc:EtOAc:AcOH 10:7:0.05)

Darstellung von 3-*tert*-Butyliodbenzen



Es wurde 3-*tert*-Butylanilin **53** (2.00 g, 13.4 mmol, 1.00 eq) langsam zu 30.0 ml HCl konz. Bei 0 °C hinzugegeben. Anschließend wurde Natriumnitrit (2.9M, 1.12 g, 16.2 mmol, 1.21 eq) hinzugegeben,

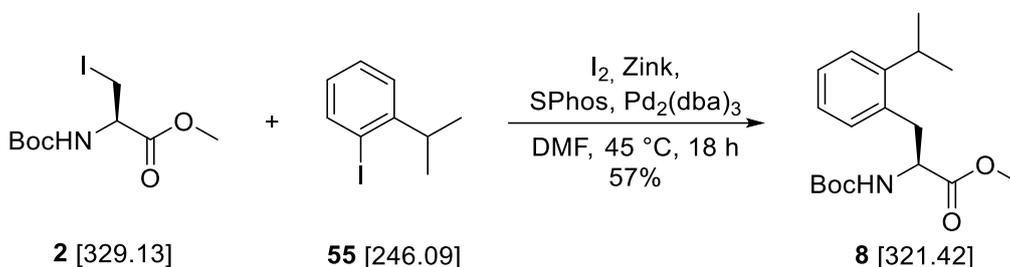
sodass die Temperatur nicht 5 °C überschritten hat. Nach 30 min rühren wurde die Reaktionslösung zu einer Lösung aus Kaliumiodid (4.2M, 27.9 g, 168 mmol, 12.54 eq) hinzugegeben und anschließend über 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde mit Diethylether extrahiert (3x) und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (2x), 0.2M Zitronensäure (2x), 20% Natriumthiosulfat und *brine* gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Säulen-chromatographische Aufarbeitung (Pentan) lieferte 3-*tert*-Butyliodbenzen **54** (2.53 g, 9.73 mmol, 72%).

¹H-NMR: 300 MHz, CDCl₃d₁, δ = 7.72 (t, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, H₂), 7.52 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H, H₆), 7.36 (td, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 0.9 Hz, 1H, H₄), 7.04 (t, ³J = 7.8 Hz, 1H, H₅), 1.31 (s, 9H, *t*Bu-CH₃).

¹³C-NMR: 75 MHz, CDCl₃d₁, δ = 153.8 (C₃), 134.8 (C₂), 134.7 (C₆), 130.0 (C₅), 124.8 (C₄), 94.7 (C₁), 34.9 (C(CH₃)₃), 31.3 (C(CH₃)₃).

DC: $R_f = 0.68$ (Pentan)

Synthese von Boc-L-Fiδ-OMe



Aktiviertes Zink (894 mg, 13.7 mmol, 3.00 eq) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben gegeben und mit 5 mL DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Iod (173 mg, 0.68 mmol, 0.15 eq). Nach 5 min wurde erneut Iod (173 mg, 0.68 mmol, 0.15 eq) und Boc-Iodalanin-Methylester (**2**, 1.50 g, 4.56 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben, woraufhin eine exotherme Reaktion einsetzte. Nach vollständiger Insertion des Zinks (30 min) wurden Pd₂(dba)₃ (209 mg, 0.23 mmol, 0.05 eq), SPhos (187 mg, 0.46 mmol, 0.10 eq) und 1-Iodo-2-isopropylbenzen (**55**, 1.46 g, 5.93 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 45 °C für 18 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit Ethylacetat verdünnt und über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser und *brine* gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatografisch gereinigt (Dichlormethan:Methanol 100:0.7) und lieferte Boc- δ -*iso*-propyl-L-Phenylalanin-methylester **8** (836 mg, 2.60 mmol, 57%) als braunes Öl.

¹H-NMR: 300 MHz, DMSO-d₆, δ = 7.34 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H, NH), 7.27 (d, ³J = 7.3 Hz, 1H, H ϵ), 7.19 (dt, ³J = 6.7 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 1H, H ζ), 7.15-7.00 (m, 2H, H δ' , H ϵ'), 4.12 (dt, ³J = 8.7, 4.6 Hz, 1H, H α), 3.59 (s, 3H, OMe), 3.11 (sept, ³J = 6.6 Hz, 1H, C δ -CH-CH₃), 3.08 (dd, ²J = 14.2 Hz, ³J = 5.3 Hz,

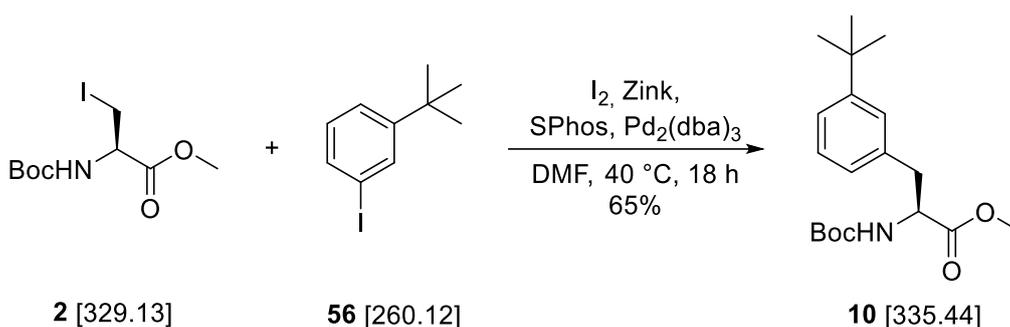
$^1\text{H-NMR}$: 2.87 (dd, $^2J = 14.2$ Hz, $^3J = 9.8$ Hz, 1H, H β), 1.31 (s, 9H, Boc), 1.18 (dd, $^3J = 6.7$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, 6H, δ -CH-CH $_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, DMSO $_d6$, $\delta = 172.5$ (COOMe), 155.3 (Boc-CO), 146.7 (C δ), 134.0 (C γ), 130.1 (C δ'), 126.9 (C ζ), 125.2 (C ϵ'), 125.2 (C ϵ), 78.2 (C(CH $_3$) $_3$), 54.8 (C α), 51.7 (OMe), 33.5 (C β), 28.1 (C(CH $_3$) $_3$), 27.9 (C δ -CH-CH $_3$), 24.0 (C δ -CH-CH $_3$), 23.7 (C δ -CH-CH $_3$).

HRMS (ESI $^+$): ber. für [C $_{18}$ H $_{27}$ NO $_4$ Na] [M+Na] $^+$: 344.1832, gef.: 344.1841.

DC: $R_f = 0.22$ (DCM:MeOH 100:0.7)

Darstellung von Boc-L-F ϵ -OMe



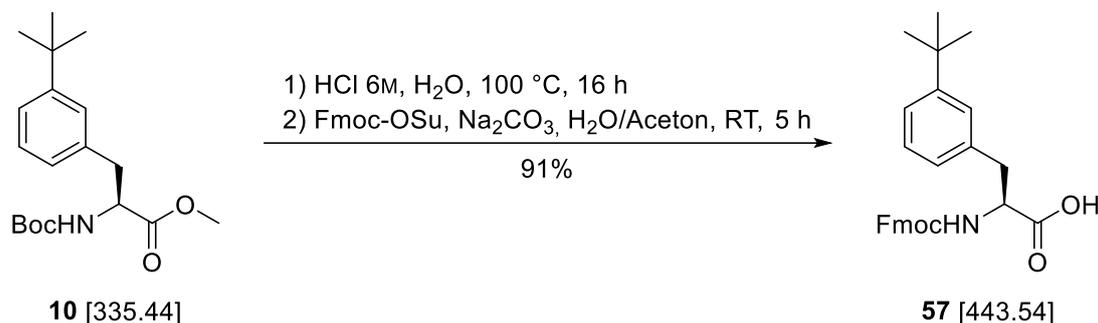
Zuvor aktiviertes Zink (596 mg, 9.12 mmol, 3.00 eq) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben gegeben und mit 4 mL DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Iod (115 mg, 0.46 mmol, 0.15 eq). Nach 5 min wurde erneut Iod (115 mg, 0.46 mmol, 0.15 eq) und Boc-Iodalanin-Methylester (**2**, 1.06 g, 3.04 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben, woraufhin eine exotherme Reaktion einsetzte. Nach vollständiger Insertion des Zinks (30 min) wurden Pd $_2$ (dba) $_3$ (139 mg, 0.15 mmol, 0.05 eq), SPhos (124 mg, 0.30 mmol, 0.10 eq) und 1-Iodo-3-*tert*-butylbenzen (**56**, 1.03 g, 3.96 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 40 °C über 18 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit Ethylacetat verdünnt und über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser und *brine* gewaschen, über MgSO $_4$ getrocknet, abfiltriert und unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 15:1, dann 10:1) und es wurden 665 mg (1.98 mmol, 65%) Boc-L- ϵ -*tert*-butyl-phenylalaninmethylester **10** als braunes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, DMSO $_d6$, $\delta = 7.27$ (d, $^3J = 8.4$ Hz, 1H, NH), 7.23 (s, 1H, H δ), 7.23 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 1H, H ζ), 7.19 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 1H, H δ'), 7.02 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 1H, NH), 4.18 (ddd, $^3J = 9.3, 8.4, 5.4$ Hz, 1H, H α), 3.60 (s, 3H, OMe), 2.98 (dd, $^2J = 13.9$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, 1H, H β), 2.85 (dd, $^2J = 13.7$ Hz, $^3J = 9.9$ Hz, 1H, H β), 1.32 (s, 9H, Boc), 1.26 (s, 9H, ϵ -C(CH $_3$) $_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$: 150 MHz, DMSO $_d6$, $\delta = 172.6$ (COOMe), 155.2 (COO*t*Bu), 150.4 (C ϵ), 137.0 (C γ), 127.8 (C ϵ'), 126.1 (C δ), 125.9 (C δ'), 123.1 (C ζ), 78.1 (OC-(CH $_3$) $_3$), 54.9 (C α), 51.7 (OMe), 36.6 (C β), 34.2 (ϵ C-(CH $_3$) $_3$), 31.1 (ϵ C-(CH $_3$) $_3$), 28.1 (C-(CH $_3$) $_3$).

DC: $R_f = 0.21$ (Cyclohexan:EtOAc 10:1)

Synthese von Fmoc-L-Fte



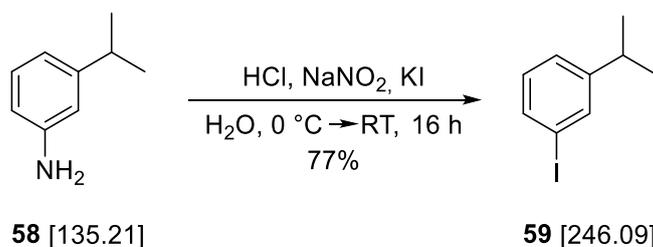
3-*tert*-butyl-L-Phenylalaninmethylester **10** (700 mg, 2.09 mmol, 1.00 eq) wurde in einem Kolben vorgelegt und 6.00 mL HCl (6 M, 36 mmol, 17.2 eq) hinzugegeben. Die Suspension wurde auf 100 °C erhitzt und bei dieser Temperatur 16 h unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter verminderten Druck entfernt und mit Diethylether verrieben (3x). Der Rückstand wurde in 20 mL Wasser gelöst und auf 0 °C gekühlt. Fmoc-OSu (692 mg, 2.05 mmol, 0.98 eq) wurde in 20 mL Aceton gelöst und langsam zur Reaktionslösung hinzugegeben. Der pH-Wert wurde mit 10% Na₂CO₃-Lösung auf 9 eingestellt, das Eisbad entfernt und die Mischung für 5 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf pH = 2 eingestellt, mit Ethylacetat extrahiert (3x) und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration der Suspension wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan:Methanol:Essigsäure 25:1:0.05). Es wurde Fmoc- ϵ -*tert*-butyl-L-Phenylalanin **57** (844 mg, 1.90 mmol, 91%) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO_{d6}, δ = 12.73 (s, 1H, COOH), 7.87 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.71 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1H, NH), 7.65 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.40 (dt, $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 2.7$ Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.32 (s, 1H, H δ), 7.30 (t, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.27 (t, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.22 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, H ζ), 7.19 (t, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, H ϵ'), 7.07 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, H δ'), 4.26-4.14 (m, 4H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH, H α), 3.08 (dd, $^2J = 13.9$ Hz, $^3J = 4.1$ Hz, 1H, H β), 2.88 (dd, $^2J = 13.7$ Hz, $^3J = 10.7$ Hz, 1H, H β), 1.25 (s, 9H, ϵ -C-(CH₃)₃).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 173.4 (COOH), 155.9 (Fmoc-CO), 150.4 (C ϵ), 143.7, 143.7, 140.6 (Fmoc-C_{arom}), 137.5 (C γ), 127.9 (C ϵ'), 127.6, 127.0 (Fmoc-CH_{arom}), 126.1 (C δ), 126.0 (C δ'), 125.2, 125.2 (Fmoc-CH_{arom}), 123.1 (C ζ), 120.0 (Fmoc-CH_{arom}), 65.6 (Fmoc-CH₂), 55.5 (C α), 46.6 (Fmoc-CH), 36.6 (C β), 34.2 (C(CH₃)₃), 31.1 (C(CH₃)₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₂₈H₂₉NO₄Na] [M+Na]⁺: 466.1989, gef.: 466.1999.

DC: $R_f = 0.38$ (DCM:MeOH:AcOH 25:1:0.05)

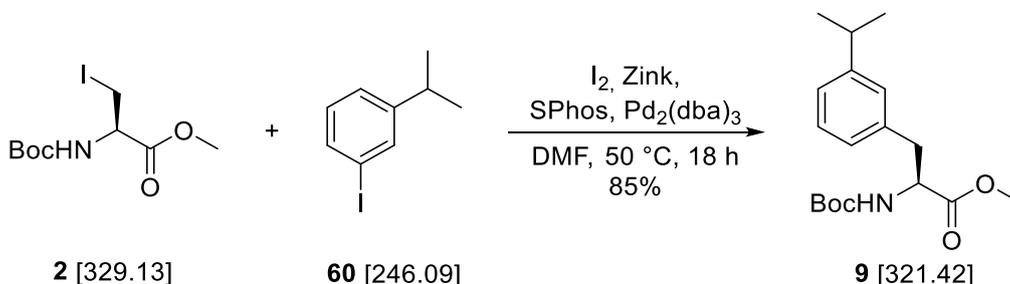
Darstellung von 3-*iso*-Propyliodbenzen


Es wurde 3-*iso*-propylanilin **58** (2.00 g, 14.8 mmol, 1.00 eq) langsam zu 45.0 ml HCl konz. Bei 0 °C hinzugegeben. Anschließend wurde Natriumnitrit (2.9M, 1.24 g, 17.9 mmol, 1.21 eq) hinzugegeben, sodass die Temperatur nicht 5 °C überschritten hat. Nach 30 min rühren wurde die Reaktionslösung zu einer Lösung aus Kaliumiodid (4.2 M, 24.6 g, 166 mmol, 10.00 eq) hinzugegeben und anschließend über 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde mit Diethylether extrahiert (3x) und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser, 0.2M Zitronensäure, gesättigte Natriumthiosulfat und *brine* gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Säulen-chromatographische Aufarbeitung (Pentan) lieferte 3-*iso*-Propyliodbenzen **59** (2.79 g, 11.3 mmol, 77%).

¹H-NMR: 300 MHz, CDCl₃, δ = 7.58 (t, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H2), 7.52 (ddd, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.4, 1.2 Hz, 1H, H6), 7.19 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H, H4), 7.03 (t, ³J = 7.7 Hz, 1H, H5), 2.84 (sept, ³J = 7.0 Hz, 1H, Cε-CH-CH₃), 1.24 (d, ³J = 7.0 Hz, 6H, CH₃).

¹³C-NMR: 75 MHz, CDCl₃, δ = 151.5 (C3), 135.8 (C2), 135.0 (C6), 130.2 (C5), 125.9 (C4), 94.7 (C1), 34.0 (C-(CH₃)₂), 23.9 (C-(CH₃)₂).

DC: $R_f = 0.64$ (Pentan)

Synthese von Boc-L-Fie-OMe


Aktiviertes Zink (596 mg, 9.11 mmol, 3.00 eq) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben gegeben und mit 4 mL DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Iod (115 mg, 0.46 mmol, 0.15 eq). Nach 5 min wurde erneut Iod (115 mg, 0.46 mmol, 0.15 eq) und Boc-Iodalanin-Methylester (**2**, 1.00 g, 3.04 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben, woraufhin eine exotherme Reaktion einsetzte. Nach vollständiger Insertion des Zinks (30 min) wurden Pd₂(dba)₃ (140 mg, 0.15 mmol, 0.05 eq), SPhos (125 mg, 0.30 mmol, 0.10 eq) und 1-Iodo-3-*iso*-propylbenzen (**60**, 972 mg, 3.95 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben.

Die Reaktionslösung wurde bei 50 °C für 18 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit Ethylacetat verdünnt und über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser und *brine* gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan:Methanol 100:0.8) und lieferte Boc- ϵ -*iso*-propyl-L-Phenylalanin-methylester **9** (826 mg, 2.57 mmol, 85%) als braunes Öl.

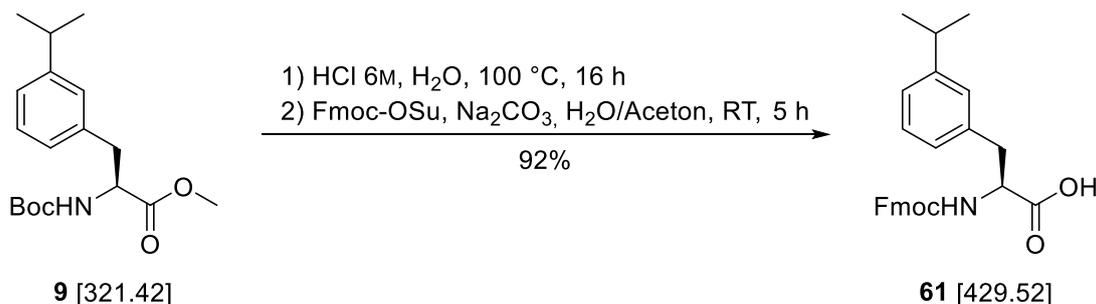
¹H-NMR: 600 MHz, DMSO_{d6}, δ = 7.26 (d, 3J = 8.1 Hz, 1H, NH), 7.19 (t, 3J = 7.8 Hz, 1H, H ϵ'), 7.09-7.06 (m, 2H, H δ , H ζ), 7.03 (d, 3J = 7.5 Hz, 1H, H δ'), 4.17 (dt, 3J = 9.0, 5.2 Hz, 1H, H α), 3.60 (s, 3H, OMe), 2.96 (dd, 2J = 13.8 Hz, 3J = 5.0 Hz, 1H, H β), 2.87-2.80 (m, 2H, H β , ϵ -CH-CH₃), 1.32 (s, 9H, Boc), 1.18 (d, 3J = 6.9 Hz, 6H, ϵ -CH-CH₃).

¹³C-NMR: 150 MHz, DMSO_{d6}, δ = 172.6 (COOMe), 155.3 (Boc-CO), 148.2 (C ϵ), 137.4 (C γ), 128.1 (C ϵ'), 127.0 (C δ), 126.5 (C δ'), 124.3 (C ζ), 78.2 (C(CH₃)₃), 55.0 (C α), 51.7 (OMe), 36.5 (C β), 33.3 (C ϵ -CH-CH₃), 28.1 (C(CH₃)₃), 23.9 (C ϵ -CH-CH₃), 23.9 (C ϵ -CH-CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₁₈H₂₇NO₄Na] [M+Na]⁺: 344.1832, gef.: 344.1841.

DC: R_f = 0.40 (DCM:MeOH 100:0.8)

Darstellung von Fmoc-L-Fie



Boc- ϵ -*iso*-propyl-L-Phenylalaninmethylester **9** (604 mg, 1.88 mmol, 1.00 eq) wurde in einem Kolben vorgelegt und 5.00 mL HCl (6 M, 30 mmol, 16.0 eq) hinzugegeben. Die Suspension wurde auf 100 °C erhitzt und bei dieser Temperatur 16 h unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und mit Diethylether verrieben (3x). Der Rückstand wurde in 20 mL Wasser gelöst und auf 0 °C gekühlt. Fmoc-OSu (621 mg, 1.84 mmol, 0.98 eq) wurde in 20 mL Aceton gelöst und langsam zur Reaktionslösung hinzugegeben. Der pH-Wert wurde mit 10% Na₂CO₃-Lösung auf 9 eingestellt, das Eisbad entfernt und die Mischung für 5 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf pH = 2 eingestellt, wobei ein Feststoff ausfiel. Dieser wurde filtriert und mit Wasser (3x) und Petrolether (3x) gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan:Methanol:Essigsäure 25:1:0.05). Es wurde Fmoc- ϵ -*iso*-propyl-L-Phenylalanin **61** (743 mg, 1.73 mmol, 92%) als farbloser Feststoff erhalten.

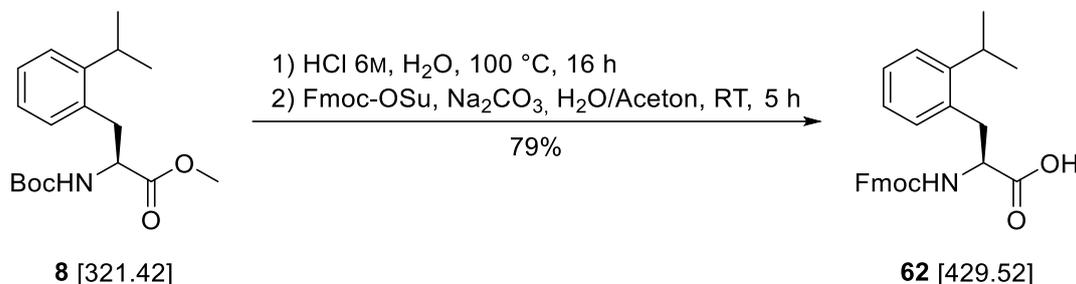
¹H-NMR: 500 MHz, DMSO_{d6}, δ = 7.87 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.71 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H, NH), 7.65 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.40 (ddt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 3.0, 0.8 Hz 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.30 (dt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.27 (dt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.18 (t, ³J = 7.7 Hz, 1H, Hε'), 7.15 (s, 1H, Hδ), 7.08-7.05 (m, 2H, Hδ', Hζ), 4.23-4.14 (m, 4H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH, Hα), 3.06 (dd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 4.3 Hz, 1H, Hβ), 2.86 (dd, ²J = 13.8 Hz, ³J = 10.6 Hz, 1H, Hβ), 2.83 (sept, ³J = 6.9 Hz, 1H, ε-CH-CH₃) 1.16 (dd, ³J = 6.9 Hz, ⁴J = 4.7 Hz, 6H, ε-CH-(CH₃)₂).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 173.3 (COOH), 155.9 (Fmoc-CO), 148.1 (Cε), 143.7, 143.7, 140.6 (Fmoc-C_{arom}), 137.8 (Cγ), 128.1 (Cε'), 127.6 (Fmoc-CH_{arom}), 127.1 (Cδ), 127.0 (Fmoc-CH_{arom}), 126.4 (Cδ'), 125.2, 125.2 (Fmoc-CH_{arom}), 124.2 (Cζ), 120.0 (Fmoc-CH_{arom}), 65.6 (Fmoc-CH₂), 55.4 (Cα), 46.6 (Fmoc-CH), 36.5 (Cβ), 33.3 (C(CH₃)₂), 23.8 (C(CH₃)₂).

HRMS (ESI+): ber. für [C₂₇H₂₇NO₄Na] [M+Na]⁺: 452.1832, gef.: 452.1844.

DC: *R_f* = 0.36 (DCM:MeOH:AcOH 25:1:0.05)

Synthese von Fmoc-L-Fiδ



Boc-L-δ-*iso*-propyl-Phenylalaninmethylester **8** (816 mg, 2.54 mmol, 1.00 eq) wurde in einem Kolben vorgelegt und 6.00 mL HCl (6 M, 36 mmol, 14.2 eq) hinzugegeben. Die Suspension wurde auf 100 °C erhitzt und bei dieser Temperatur 16 h unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter verminderten Druck entfernt und mit Diethylether verrieben (3x). Der Rückstand wurde in 20 mL Wasser gelöst und auf 0 °C gekühlt. Fmoc-OSu (822 mg, 2.44 mmol, 0.98 eq) wurde in 20 mL Aceton gelöst und langsam zur Reaktionslösung hinzugegeben. Der pH-Wert wurde mit 10% Na₂CO₃-Lösung auf 9 eingestellt, das Eisbad entfernt und die Mischung für 5 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf pH = 2 eingestellt, wobei ein Feststoff ausfiel. Dieser wurde filtriert und mit Wasser (3x) und Petrolether (3x) gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan:Methanol:Essigsäure 25:1:0.05). Es wurde Fmoc-L-δ-*iso*-propyl-Phenylalanin **62** (862 mg, 2.08 mmol, 79%) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO_{d6}, δ = 12.80 (s, 1H, COOH), 7.88 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.80 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, NH), 7.67 (d, ³J = 7.4 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.64 (d, ³J = 7.4 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.40 (ddt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 4.6, 0.8 Hz 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.32 (dt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.0 Hz,

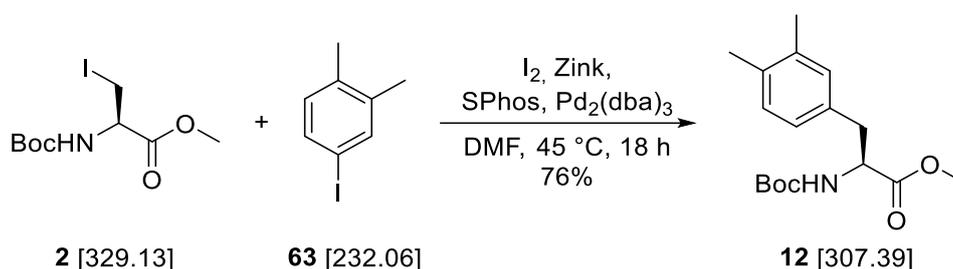
^1H , Fmoc- CH_{arom}), 7.30-7.26 (m, 2H, Fmoc- CH_{arom} , H ϵ), 7.22-7.16 (m, 2H, H δ' , H ζ), 7.06 (dt, $^3J = 7.5$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 1H, H ϵ'), 4.23-4.14 (m, 3H, Fmoc- CH_2 , Fmoc-CH), 4.11 (dt, $^3J = 9.3$, 4.3 Hz, 1H, H α), 3.25-3.17 (m, 2H, δ -CH-(CH_3) $_2$, H β), 2.85 (dd, $^2J = 14.0$ Hz, $^3J = 10.6$ Hz, 1H, H β), 1.19 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 3H, δ -CH-(CH_3) $_2$), 1.17 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 3H, δ -CH-(CH_3) $_2$).

^{13}C -NMR: 75 MHz, DMSO_{d_6} , $\delta = 173.4$ (COOH), 155.9 (Fmoc-CO), 146.7 (C δ), 143.7, 143.7, 140.6 (Fmoc-C $_{\text{arom}}$), 134.4 (C γ), 130.3 (C δ'), 127.6, 127.0 (Fmoc- CH_{arom}), 126.9 (C ζ), 125.2 (C ϵ), 125.2 (C ϵ'), 125.2, 120.0 (Fmoc- CH_{arom}), 65.6 (Fmoc- CH_2), 55.2 (C α), 46.5 (Fmoc-CH), 33.6 (C β), 27.8 (C-(CH_3) $_2$), 24.1 (C(CH_3) $_2$), 23.7 (C(CH_3) $_2$).

HRMS (ESI+): ber. für $[\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{NO}_4\text{Na}] [\text{M}+\text{Na}]^+$: 452.1832, gef.: 452.1843.

DC: $R_f = 0.37$ (DCM:MeOH:AcOH 25:1:0.05)

Darstellung von Boc-L-FxO-OMe



Zuvor aktiviertes Zink (715 mg, 10.94 mmol, 3.00 eq) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben gegeben und mit 5 mL DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Iod (188 mg, 0.55 mmol, 0.15 eq). Nach 5 min wurde erneut Iod (188 mg, 0.55 mmol, 0.15 eq) und Boc-Iodalanin-Methylester (**2**, 1.20 g, 3.64 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben, woraufhin eine exotherme Reaktion einsetzte. Nach vollständiger Insertion des Zinks (30 min) wurden $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (167 mg, 0.18 mmol, 0.05 eq), SPhos (150 mg, 0.365 mmol, 0.10 eq) und 1-Iodo-3,4-dimethylbenzen (1.10 g, 4.74 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 45 °C über 18 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit EtOAc verdünnt und über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen, mit Wasser und ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatografische gereinigt (Dichlormethan/Methanol 100:0.6) und es wurden 850 mg (2.76 mmol, 76%) von Boc-L- ϵ , ζ -dimethyl-phenylalaninmethylester **12** als braunes Öl erhalten.

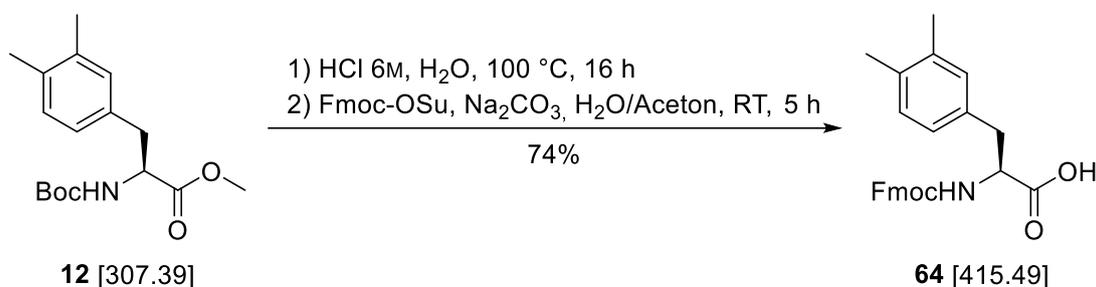
^1H -NMR: 300 MHz, DMSO_{d_6} , $\delta = 7.22$ (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 7.02 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, H ϵ') 6.98 (s, 1H, H δ), 6.93 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, H δ'), 4.17-4.05 (m, 1H, H α), 3.60 (s, 3H, OMe), 2.90 (dd, $^2J = 13.7$ Hz, $^3J = 5.1$ Hz, 1H, H β), 2.77 (dd, $^2J = 13.6$ Hz, $^3J = 9.9$ Hz, 1H, H β), 2.17 (s, 3H, ϵ - CH_3), 2.16 (s, 3H, ζ - CH_3), 1.33 (s, 9H, Boc).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 172.6 (COOMe), 155.3 (COOtBu), 135.7 (Cε), 134.7 (Cγ), 134.0 (Cζ), 130.1 (Cδ), 129.2 (Cε'), 126.3 (Cδ'), 78.2 (C-(CH₃)₃), 55.3 (Cα), 51.6 (OMe), 36.0 (Cβ), 28.1 (C-(CH₃)₃), 19.3 (Cε-CH₃), 18.9 (Cζ-CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₁₇H₂₆NO₄] [M+H]⁺: 308.1856, gef.: 308.1866.

DC: *R_f* = 0.53 (DCM/MeOH 100:0.6)

Synthese von Fmoc-L-FxO



Boc-L-ε,ζ-dimethyl-Phenylalaninmethylester **12** (685 mg, 2.23 mmol, 1.00 eq) wurde in einem Kolben vorgelegt und 6.00 mL HCl (6 M, 36 mmol, 16.1 eq) hinzugegeben. Die Suspension wurde auf 100 °C erhitzt und bei dieser Temperatur 16 h unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter verminderten Druck entfernt und mit Diethylether verrieben (3x). Der Rückstand wurde in 20 mL Wasser gelöst und auf 0 °C gekühlt. Fmoc-OSu (722 mg, 2.14 mmol, 0.98 eq) wurde in 20 mL Aceton gelöst und langsam zur Reaktionslösung hinzugegeben. Der pH-Wert wurde mit 10% Na₂CO₃-Lösung auf 9 eingestellt, das Eisbad entfernt und die Mischung für 5 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf pH = 2 eingestellt, wobei ein Feststoff ausfiel. Dieser wurde filtriert und mit Wasser (3x) und Petrolether (3x) gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan:Methanol:Essigsäure 25:1:0.05). Es wurde Fmoc-L-ε,ζ-dimethyl-Phenylalanin **64** (690 mg, 1.66 mmol, 74%) als farbloser Feststoff erhalten.

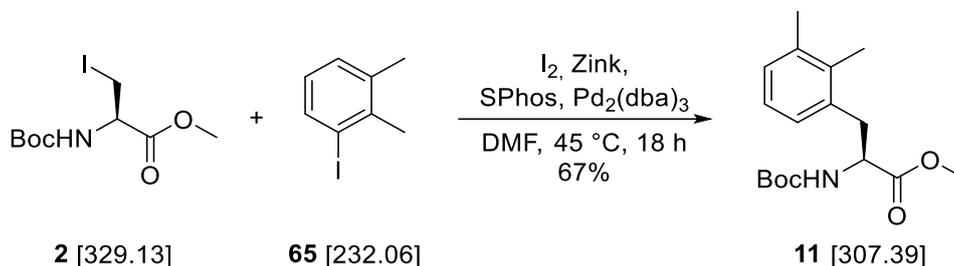
¹H-NMR: 500 MHz, DMSO_{d6}, δ = 12.75 (s, 1H, COOH), 7.88 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.74 (d, ³J = 8.5 Hz, 1H, NH), 7.67 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.64 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.40 (dt, ³J = 7.4 Hz, ³J = 5.2 Hz 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.32 (dt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.30-7.26 (dt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.06 (d, ³J = 7.4 Hz, 1H, Hε), 7.00 (s, 1H, Hδ), 6.97 (d, ³J = 7.4 Hz, 1H, Hδ'), 4.22-4.13 (m, 3H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH), 4.11 (dt, ³J = 8.7, 4.3 Hz, 1H, Hα), 3.15 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 4.2 Hz, 1H, Hβ), 2.88 (dd, ²J = 14.1 Hz, ³J = 10.4 Hz, 1H, Hβ), 2.22 (s, 3H, ε-CH₃), 2.18 (s, 3H, ζ-CH₃).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 173.5 (COOH), 156.0 (Fmoc-CO), 143.7, 140.6 (Fmoc-C_{arom}), 135.7 (Cε), 135.2 (Cγ), 134.0 (Cζ), 130.2 (Cδ), 129.3 (Cε'), 127.6, 127.0 (Fmoc-CH_{arom}), 126.4 (Cδ'), 125.3, 125.2, 120.0 (Fmoc-CH_{arom}), 65.7 (Fmoc-CH₂), 55.7 (Cα), 46.5 (Fmoc-CH), 36.2 (Cβ), 19.4 (Cε-CH₃), 18.9 (Cζ-CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für $[C_{26}H_{26}NO_4]$ $[M+H]^+$: 416.1856, gef.: 416.1863.

DC: $R_f = 0.35$ (DCM:MeOH:AcOH 25:1:0.05)

Darstellung von Boc-L-Fxo-OMe



Zuvor aktiviertes Zink (715 mg, 10.94 mmol, 3.00 eq) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben gegeben und mit 5 mL DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Iod (188 mg, 0.55 mmol, 0.15 eq). Nach 5 min wurde erneut Iod (188 mg, 0.55 mmol, 0.15 eq) und Boc-Iodalanin-Methylester (**2**, 1.20 g, 3.64 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben, woraufhin eine exotherme Reaktion einsetzte. Nach vollständiger Insertion des Zinks (30 min) wurden $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (167 mg, 0.18 mmol, 0.05 eq), SPhos (150 mg, 0.365 mmol, 0.10 eq) und 1-Iodo-2,3-dimethylbenzen (**65**, 1.10 g, 4.74 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 45 °C über 18 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit EtOAc verdünnt und über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen, mit Wasser und ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatografisch gereinigt (CHCl_3) und es wurden 750 mg (2.44 mmol, 67%) des Boc-L- δ,ϵ -dimethyl-phenylalaninmethylester **11** als braunes Öl erhalten.

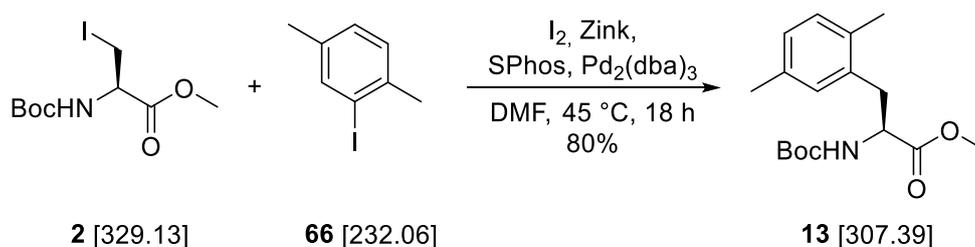
$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, DMSO-d_6 , $\delta = 7.31$ (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1H, NH), 7.03-6.96 (m, 3H, CH_{arom}) 4.09 (dd, $^3J = 8.3$ Hz, 5.0 Hz, 1H, H α), 3.60 (s, 3H, OMe), 3.04 (dd, $^2J = 14.0$ Hz, $^3J = 5.0$ Hz, 1H, H β), 2.84 (dd, $^2J = 13.6$ Hz, $^3J = 9.5$ Hz, 1H, H β), 2.22 (s, 3H, $\epsilon\text{-CH}_3$), 2.17 (s, 3H, $\delta\text{-CH}_3$), 1.32 (s, 9H, Boc).

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, DMSO-d_6 , $\delta = 172.7$ (COOMe), 155.4 (COOtBu), 136.3 (C γ), 135.5 (C ϵ), 134.5 (C δ), 128.2 (C ζ), 127.9 (C ϵ'), 124.9 (C δ'), 78.2 (C-(CH₃)₃), 54.2 (C α), 51.7 (OMe), 34.6 (C β), 28.1 (C-(CH₃)₃), 20.3 ($\epsilon\text{-CH}_3$), 14.6 ($\delta\text{-CH}_3$).

HRMS (ESI+): ber. für $[C_{17}H_{25}NO_4\text{Na}]$ $[M+\text{Na}]^+$: 331.1709, gef.: 331.1712.

DC: $R_f = 0.42$ (CHCl_3)

Synthese von Boc-L-Fxp-OMe



Zuvor aktiviertes Zink (715 mg, 10.94 mmol, 3.00 eq) wurde in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben gegeben und mit 5 mL DMF versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Iod (188 mg, 0.55 mmol, 0.15 eq). Nach 5 min wurde erneut Iod (188 mg, 0.55 mmol, 0.15 eq) und Boc-Iodalanin-Methylester (**2**, 1.20 g, 3.64 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben, woraufhin eine exotherme Reaktion einsetzte. Nach vollständiger Insertion des Zinks (30 min) wurden Pd₂(dba)₃ (167 mg, 0.18 mmol, 0.05 eq), SPhos (150 mg, 0.365 mmol, 0.10 eq) und 1-Iodo-2,5-dimethylbenzen (**66**, 1.10 g, 4.74 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 45 °C über 18 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit Ethylacetat verdünnt und über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser und *brine* gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CHCl₃) und es wurden 895 mg (2.91 mmol, 80%) Boc-L-δ,ε'-dimethyl-phenylalaninmethylester **13** als beiger Feststoff erhalten.

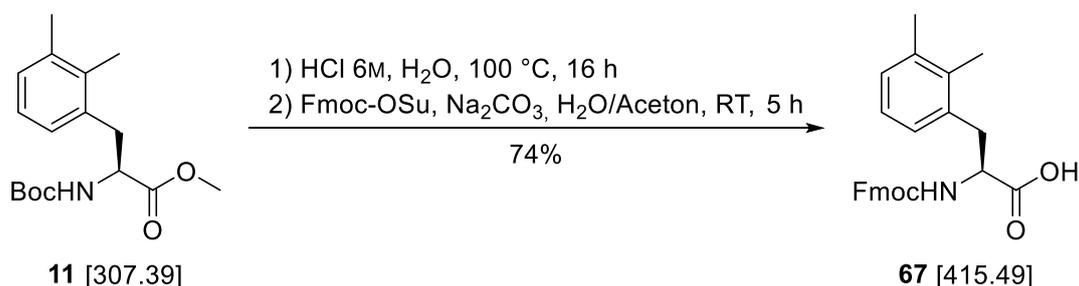
¹H-NMR: 300 MHz, DMSO_{d6}, δ = 7.31 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, NH), 7.02 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, H_ε), 6.94 (s, 1H, H_{δ'}), 6.92 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, H_ζ), 4.15 (dd, ³J = 8.4 Hz, 5.2 Hz, 1H, H_α), 3.60 (s, 3H, OMe), 2.97 (dd, ²J = 14.2 Hz, ³J = 5.2 Hz, 1H, H_β), 2.80 (dd, ²J = 13.6 Hz, ³J = 9.5 Hz, 1H, H_β), 2.22 (s, 6H, δ-CH₃, ε'-CH₃), 1.32 (s, 9H, Boc).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 172.9 (COOMe), 155.6 (COOtBu), 135.7 (C_γ), 134.5 (C_{ε'}), 133.0 (C_δ), 130.4 (C_ε), 130.1 (C_{δ'}), 127.3 (C_ζ), 78.4 (C-(CH₃)₃), 53.9 (C_α), 51.0 (OMe), 34.2 (C_β), 28.3 (C-(CH₃)₃), 20.7 (C_{ε'}-CH₃), 18.6 (C_δ-CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₁₇H₂₅NO₄Na] [M+Na]⁺: 330.1676, gef.: 330.1676.

DC: R_f = 0.31 (CHCl₃)

Synthese von Fmoc-L-Fxo



Boc-L- δ,ϵ -dimethyl-Phenylalaninmethylester **11** (679 mg, 2.21 mmol, 1.00 eq) wurde in einem Kolben vorgelegt und 6.00 mL HCl (6 M, 36 mmol, 16.3 eq) hinzugegeben. Die Suspension wurde auf 100 °C erhitzt und bei dieser Temperatur 16 h unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter verminderten Druck entfernt und mit Diethylether verrieben (3x). Der Rückstand wurde in 20 mL Wasser gelöst und auf 0 °C gekühlt. Fmoc-OSu (695 mg, 2.06 mmol, 0.98 eq) wurde in 20 mL Aceton gelöst und langsam zur Reaktionslösung hinzugegeben. Der pH-Wert wurde mit 10% Na₂CO₃-Lösung auf 9 eingestellt, das Eisbad entfernt und die Mischung für 5 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf pH = 2 eingestellt, wobei ein Feststoff ausfiel. Dieser wurde filtriert und mit Wasser (3x) und Petrolether (3x) gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan:Methanol:Essigsäure 25:1:0.05). Es wurde Fmoc-L- δ,ϵ -dimethyl-Phenylalanin **67** (650 mg, 1.56 mmol, 74%) als farbloser Feststoff erhalten.

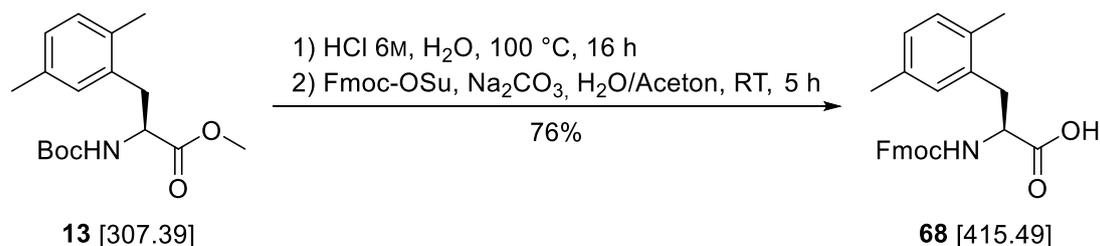
¹H-NMR: 600 MHz, DMSO_{d6}, δ = 12.76 (s, 1H, COOH), 7.88 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.76 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, NH), 7.67 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.64 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.41 (dt, ³J = 7.2, 4.8 Hz 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.32 (dt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 0.7 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.30-7.26 (dt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 0.7 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.07 (d, ³J = 7.3 Hz, 1H, H ζ), 7.00 (d, ³J = 7.0 Hz, 1H, H δ'), 6.97 (t, ³J = 7.5 Hz, 1H, H ϵ'), 4.23-4.15 (m, 3H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH), 4.12 (dt, ³J = 8.7, 4.4 Hz, 1H, H α), 3.16 (dd, ²J = 14.0 Hz, ³J = 4.4 Hz, 1H, H β), 2.86 (dd, ²J = 14.0 Hz, ³J = 10.4 Hz, 1H, H β), 2.22 (s, 3H, ϵ -CH₃), 2.19 (s, 3H, δ -CH₃).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 173.5 (COOH), 155.9 (Fmoc-CO), 143.7, 140.6 (Fmoc-C_{arom}), 136.3 (C γ), 135.9 (C ϵ), 134.5 (C δ), 128.1 (C ζ), 127.9 (C ϵ'), 127.6, 127.0 (Fmoc-CH_{arom}), 125.2 (C δ'), 125.2, 120.0 (Fmoc-CH_{arom}), 65.6 (Fmoc-CH₂), 54.5 (C α), 46.5 (Fmoc-CH), 34.7 (C β), 20.3 (C ϵ -CH₃), 14.6 (C δ -CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₂₆H₂₅NO₄Na] [M+Na]⁺: 438.1676, gef.: 438.1680.

DC: R_f = 0.36 (DCM:MeOH:AcOH 25:1:0.05)

Synthese von Fmoc-L-Fxp



Boc-L- δ,ϵ' -dimethyl-Phenylalaninmethylester **13** (883 mg, 2.71 mmol, 1.00 eq) wurde in einem Kolben vorgelegt und 6.00 mL HCl (6 M, 36 mmol, 13.3 eq) hinzugegeben. Die Suspension wurde auf 100 °C erhitzt und bei dieser Temperatur 16 h unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter verminderten Druck entfernt und mit Diethylether verrieben (3x). Der Rückstand wurde in 20 mL

Wasser gelöst und auf 0 °C gekühlt. Fmoc-OSu (897 mg, 2.66 mmol, 0.98 eq) wurde in 20 mL Aceton gelöst und langsam zur Reaktionslösung hinzugegeben. Der pH-Wert wurde mit 10% Na₂CO₃-Lösung auf 9 eingestellt, das Eisbad entfernt und die Mischung für 5 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf pH = 2 eingestellt, wobei ein Feststoff ausfiel. Dieser wurde filtriert und mit Wasser (3x) und Petrolether (3x) gewaschen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan:Methanol:Essigsäure 25:1:0.05). Es wurde Fmoc-L- δ,ϵ' -dimethyl-Phenylalanin **68** (854 mg, 2.06 mmol, 76%) als farbloser Feststoff erhalten.

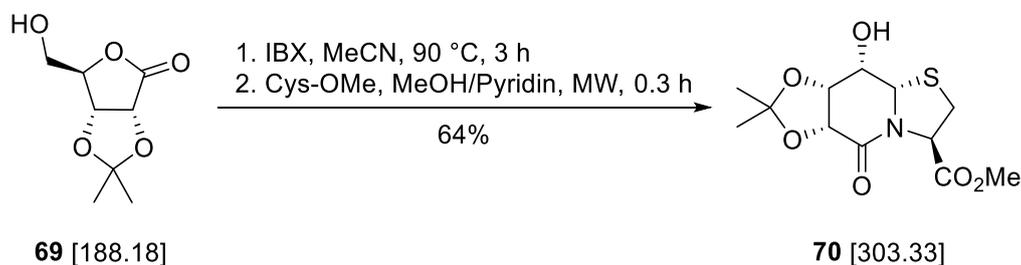
¹H-NMR: 600 MHz, DMSO_{d6}, δ = 12.77 (s, 1H, COOH), 7.88 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.77 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, NH), 7.67 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.64 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.41 (dt, ³J = 7.3 Hz, ³J = 4.9 Hz 2H, Fmoc-CH_{arom}), 7.31 (dt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 0.7 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.276 (dt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 0.7 Hz, 1H, Fmoc-CH_{arom}), 7.04 (s, 1H, H δ'), 7.01 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H, H ϵ), 6.91 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H, H ζ), 4.21-4.14 (m, 4H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH, H α), 3.08 (dd, ²J = 14.0 Hz, ³J = 4.6 Hz, 1H, H β), 2.82 (dd, ²J = 14.0 Hz, ³J = 10.3 Hz, 1H, H β), 2.25 (s, 3H, ϵ' -CH₃), 2.18 (s, 3H, δ -CH₃).

¹³C-NMR: 75 MHz, DMSO_{d6}, δ = 173.5 (COOH), 155.9 (Fmoc-CO), 143.7, 140.7, 140.6 (Fmoc-C_{arom}), 135.9 (C γ), 134.2 (C ϵ'), 132.8 (C δ), 130.4 (C ϵ), 129.9 (C δ'), 127.6, 127.0 (Fmoc-CH_{arom}), 127.0 (C ζ), 125.2, 125.2, 120.1 (Fmoc-CH_{arom}), 65.6 (Fmoc-CH₂), 54.2 (C α), 46.6 (Fmoc-CH), 34.1 (C β), 20.6 (C ϵ' -CH₃), 18.4 (C δ -CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für [C₂₆H₂₅NO₄Na] [M+Na]⁺: 439.1710, gef.: 439.1709.

DC: R_f = 0.35 (DCM:MeOH:AcOH 25:1:0.05)

Synthese eines Hot=Tap-Vorläufers



Der Alkohol **69** (8.00 g, 42.5 mmol, 1.00 eq), wurde in 70.0 mL Acetonitril vorgelegt und mit IBX (15.5 g, 55.3 mmol, 1.30 eq) in einer Portion versetzt. Hier ist auf die Reinheit des IBX zu achten (¹³C-NMR!). Verunreinigungen vermindern drastisch den Erfolg der Oxidation. Die Suspension wurde unter auf 90 °C erhitzt und 3 h bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 1 h im Eisbad gekühlt und die Suspension filtriert. Der Niederschlag wurde mit 30 mL Acetonitril gewaschen und das Filtrat unter verminderten Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in Pyridin (4.00 mL) und Methanol (30.0 mL) gelöst und 15 min entgast. Anschließend erfolgte die

Zugabe von Cysteinmethylesterhydrochlorid (8.76 g, 51.0 mmol, 1.20 eq) in einer Portion, woraufhin die Lösung wieder für 10 min entgast wurde. Die Reaktionslösung wurde in der Mikrowelle 20 min mit 75 W bestrahlt (90 °C). Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand in 20.0 mL Dichlormethan und 20.0 mL Salzsäure (1 M) aufgenommen. Die Phasen wurden separiert und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert (3x). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und diese wässrige Phase erneut mit Dichlormethan (2x) extrahiert. Sämtliche organischen Phasen wurden vereinigt und über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Es wurde der Bizyklus **70** (8.25 g, 27.2 mmol, 64%) als gelber Feststoff erhalten werden. Die Vorschrift orientiert sich an ECKHARDT *et al.*^[33], jedoch konnte durch den Einsatz von Mikrowellenstrahlung die Reaktionszeit drastisch von 2 Wochen auf 20 min reduziert werden. Zwar führt diese Route zu einer geringeren Ausbeute von 16%, der Vorteil der geringeren Reaktionszeit überwiegt jedoch. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.

7.3 Zinkfingerpeptide

Die folgenden experimentellen Daten zeigen die dargestellten Zinkfingerpeptide. Die Reinheit und analytische Vollständigkeit wurden zunächst am *apo*-Peptid bestimmt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1.50 eq Zink²⁺, gefolgt von der Erhöhung des pH-Werts durch Zugabe von Aliquoten an 10 mM NaOH-Lösung. Während zunächst mehrere μL notwendig waren, um den pH-Wert zu verändern, genügte ab einem bestimmten pH-Wert (ab 5.8-6.5) wenige μL um eine große Änderung im pH-Wert zu erreichen. Die allgemeine Vorschrift zur Präparation der NMR-Probe setzt sich wie folgt zusammen:

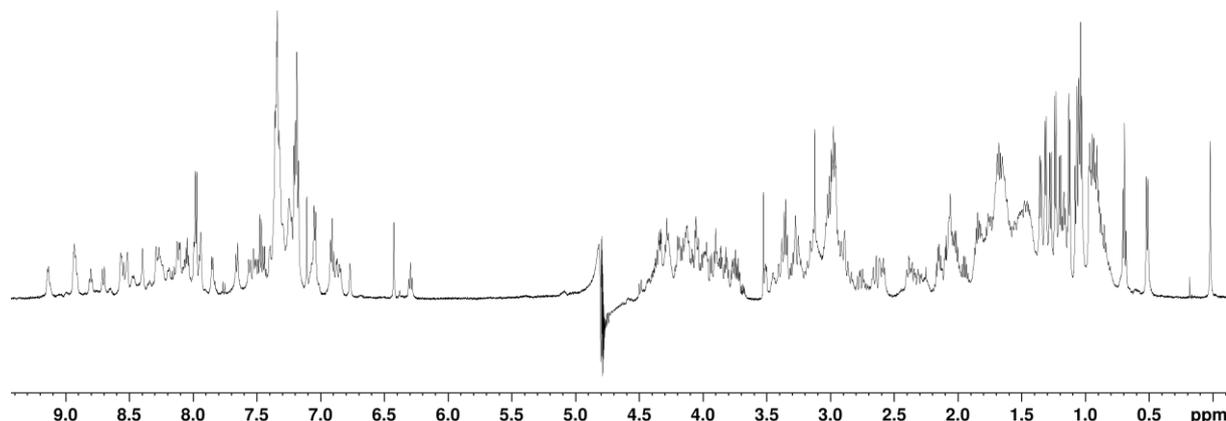
Das lyophilisierte *apo*-Peptid (1.00-3.00 mg, größere Mengen führen leicht zur Aggregation nach Erhöhung des pH-Werts) wurde in 400 μL H₂O (Millipore, entgast mit Argon, enthält 1% Natriumtrimethylsilylpropionat-*d*4) gelöst. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 1.50 eq Zink (40 10^{-3}M , Zinkchlorid in H₂O Millipore, entgast), gefolgt von 60 μL Deuteriumoxid. Zu diesem Zeitpunkt besaß die Lösung einen pH-Wert im Bereich von 3-4. Dieser wurde durch die stufenweise Zugabe von 2 μL Aliquoten von 40 10^{-3}M Natriumhydroxidlösung auf pH=5.8-7.6 eingestellt. Sollte das Endvolumina von 580 μL noch nicht erreicht sein, wurde erneut H₂O hinzugegeben. Je nach Stabilität des entsprechenden Zinkfingerderivats, konnte diese Lösung drei Tage bis zwei Wochen verwendet werden. Während dieses Zeitraums ging die Intensität der Signale stufenweise zurück, was auf Oxidation/Aggregation des Peptides hindeutet. Konnte das Peptid aufgrund von sterischen Ansprüchen keine Faltung eingehen, wurden die Verschiebungen des *apo*-Peptids angegeben. Die Sequenz der synthetisierten Zinkfingerpeptide sind sehr ähnlich, weswegen nur für die ersten Varianten diese explizit dargestellt ist. Ab Zinkfingervariante-1 (ZFV-1) besitzen sämtliche Peptide folgende Sequenz:

P¹F²Q³C⁴T⁵F⁶**Hot⁷Tap⁸**C⁹G¹⁰K¹¹R¹²**X¹³**S¹⁴L¹⁵D¹⁶F¹⁷N¹⁸L¹⁹K²⁰T²¹H²²V²³K²⁴I²⁵H²⁶T²⁷G²⁸

Daher wird bei jedem Derivat nur die Struktur der 13. Position abgebildet.

3YY1 (PXMA-010)

¹H²Q³C⁴T⁵F⁶E⁷G⁸C⁹G¹⁰K¹¹R¹²F¹³S¹⁴L¹⁵D¹⁶F¹⁷N¹⁸L¹⁹K²⁰T²¹H²²V²³K²⁴I²⁵H²⁶T²⁷G²⁸



¹H-NMR: 600 MHz, 300K, H₂O/D₂O 9:1, 1.5 eq Zn²⁺, pH = 6.0, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

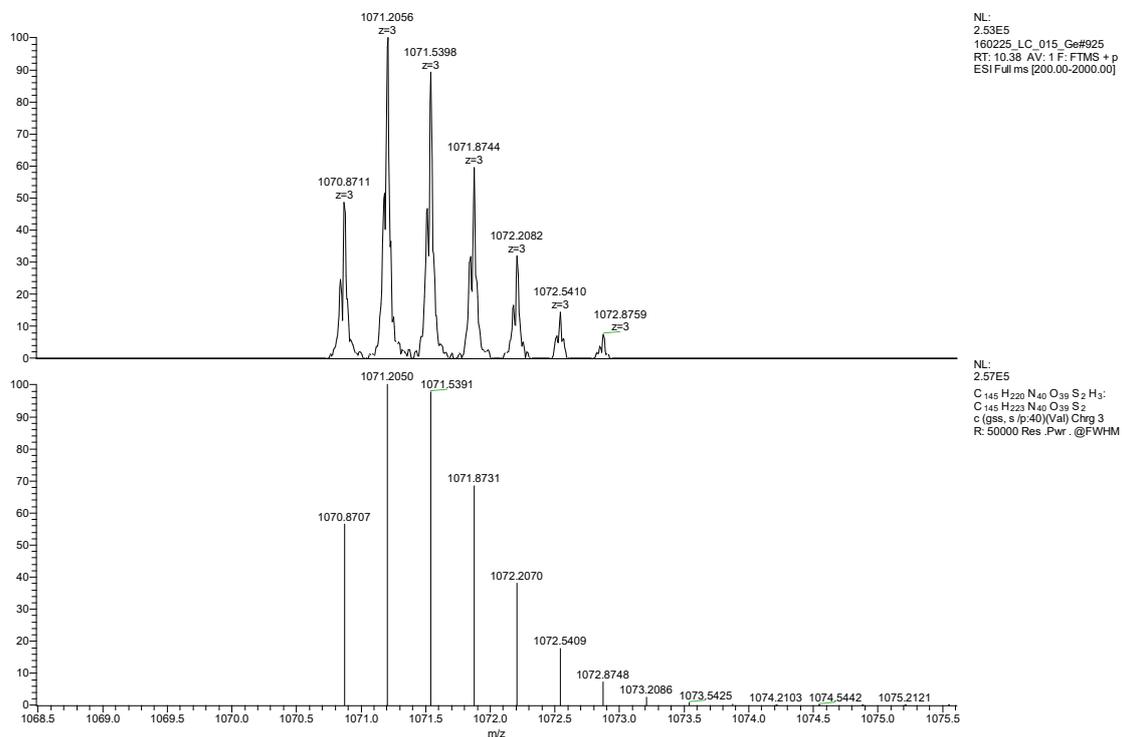
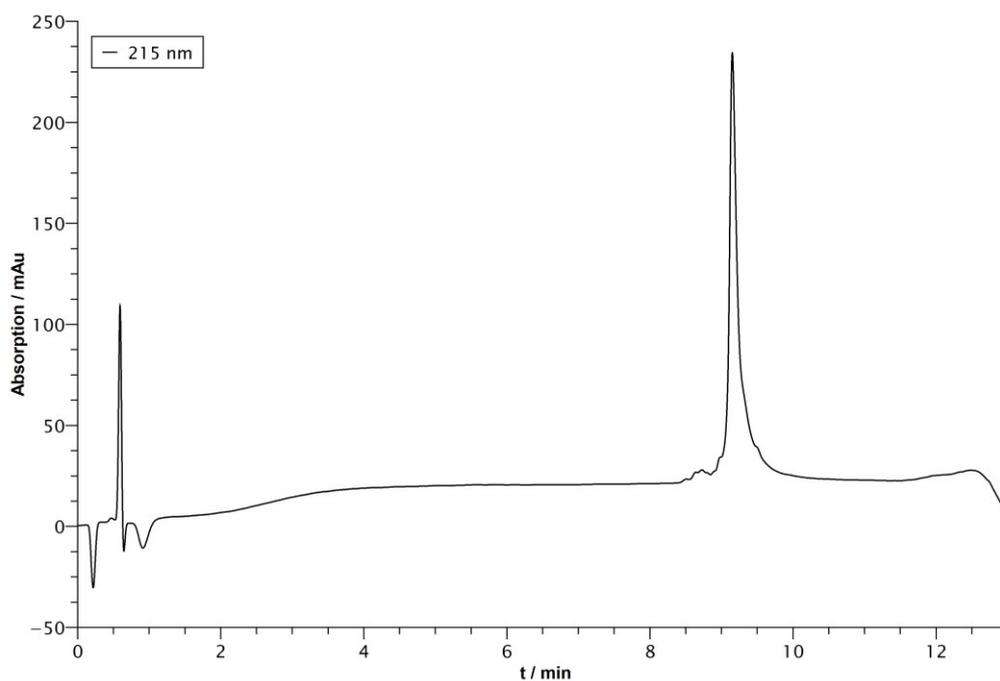
| Aminosäure | δ(NH) / ppm | δ(α) / ppm | δ(β) / ppm | δ(γ) / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|-------------|------------|------------|------------|--|
| Pro ¹ | n.b. | 4.26 | 2.35, 1.81 | 1.98 | δ: 3.32 |
| Phe ² | n.b. | 4.80 | 3.24, 2.89 | - | δ: 7.19 ε, ζ: 7.45 |
| Gln ³ | 8.91 | 5.07 | 2.09, 1.81 | 2.26, 2.10 | ε: n.b. |
| Cys ⁴ | 9.12 | 4.55 | 3.33, 2.95 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.53 | 4.46 | 4.48 | 1.25 | - |
| Phe ⁶ | 8.92 | 4.09 | 2.56, 2.36 | - | δ: 7.03 ε, ζ: 7.32 |
| Glu ⁷ | 8.38 | 3.87 | 1.82, 1.73 | 2.13 | - |
| Gly ⁸ | 8.79 | 4.15, 3.73 | - | - | - |
| Cys ⁹ | 7.97 | 4.62 | 3.24, 2.95 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.26 | 4.04, 4.00 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 8.09 | 3.96 | 1.50-1.41 | 1.32-1.26 | δ: 1.45-1.37 ε: 3.02 |
| Arg ¹² | 7.92 | 4.99 | 1.62, 1.54 | 1.50, 1.42 | δ: 3.09 ε: 7.19 |
| Phe ¹³ | 8.68 | 4.82 | 3.37, 2.62 | - | δ: 7.17 ε: 6.89 ζ: 6.28 |
| Ser ¹⁴ | 7.17 | 4.62 | 3.10, 3.07 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 7.54 | 4.86 | 1.59, 1.45 | 1.45 | δ: 1.03 |
| Asp ¹⁶ | 8.55 | 3.44 | 2.07, 2.03 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.49 | 4.11 | 3.28, 2.75 | - | δ: 7.16 ε, ζ: 7.33 |
| Asn ¹⁸ | 6.83 | 4.43 | 2.88, 2.81 | - | δ: n.b. |
| Leu ¹⁹ | 7.05 | 3.21 | 1.61 | 1.61 | δ: 1.05-1.02 |
| Lys ²⁰ | 8.11 | 3.84 | 1.73-1.60 | 1.46-1.44 | δ: 1.59-1.55 ε: 2.95 |
| Thr ²¹ | 7.49 | 3.78 | 3.99 | 1.10 | - |
| His ²² | 7.38 | 4.17 | 3.12, 2.91 | - | δ ² : 7.09 ε ¹ : 7.96 |
| Val ²³ | 8.28 | 3.47 | 2.33 | 1.33, 1.26 | - |
| Lys ²⁴ | 6.86 | 4.10 | 1.75-1.64 | 1.56-1.50 | δ: 1.79-1.74 ε: 2.96 |
| Ile ²⁵ | 7.83 | 3.87 | 1.59 | 0.90, 0.80 | γ ^{CH₃} : 0.48 |

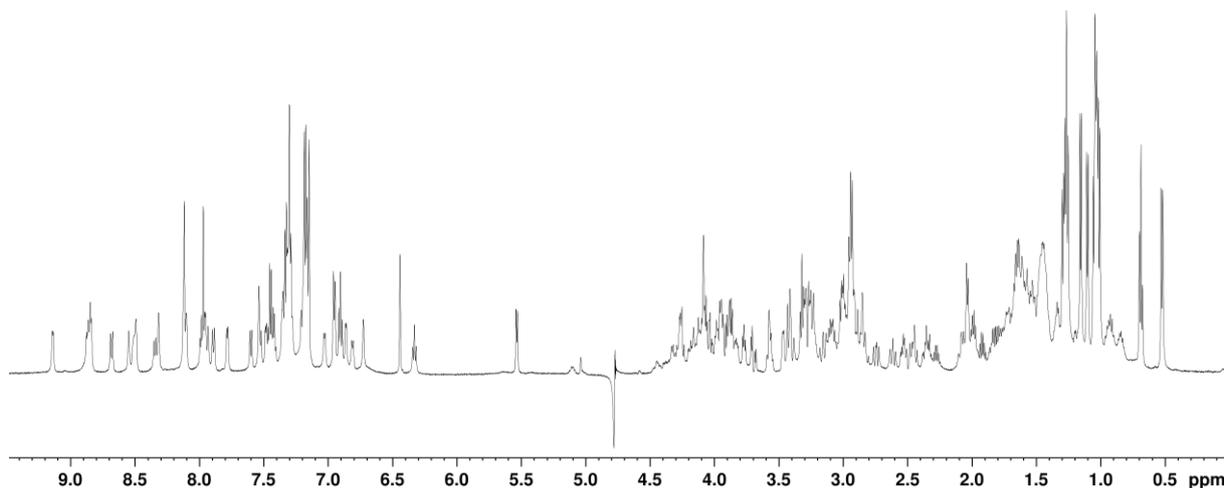
Experimenteller Teil

| | | | | | |
|-------------------|------|------------|------------|------|-----------------------|
| His ²⁶ | 7.20 | 4.39 | 2.59, 2.06 | - | δ: 0.67 |
| Thr ²⁷ | 7.64 | 4.32 | 4.38 | 1.22 | δ ² : 6.40 |
| Gly ²⁸ | 8.02 | 3.92, 3.71 | - | - | ε ¹ : 7.95 |

HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₅H₂₂₃N₄₀O₃₉S₂] [M+3H]³⁺: 1071.2050, gef.: 1071.2056

rp-HPLC: tr = 9.15 min (10% - 40% MeCN in 10 min, 0.45 mL/min).



ZFV-1 (PXMA-008)
 $P^1F^2Q^3C^4T^5F^6\text{Hot}^7\text{Tap}^8C^9G^{10}K^{11}R^{12}F^{13}S^{14}L^{15}D^{16}F^{17}N^{18}L^{19}K^{20}T^{21}H^{22}V^{23}K^{24}I^{25}H^{26}T^{27}G^{28}$

 $^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 300K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, 1.5 eq Zn^{2+} , pH = 5.8, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

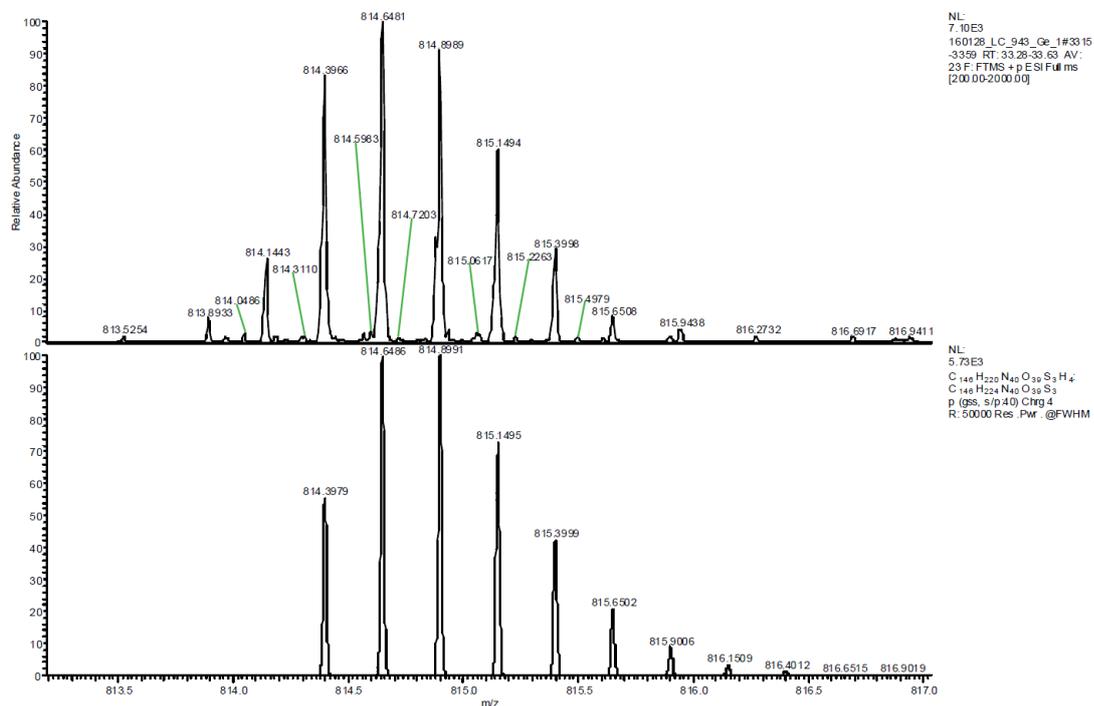
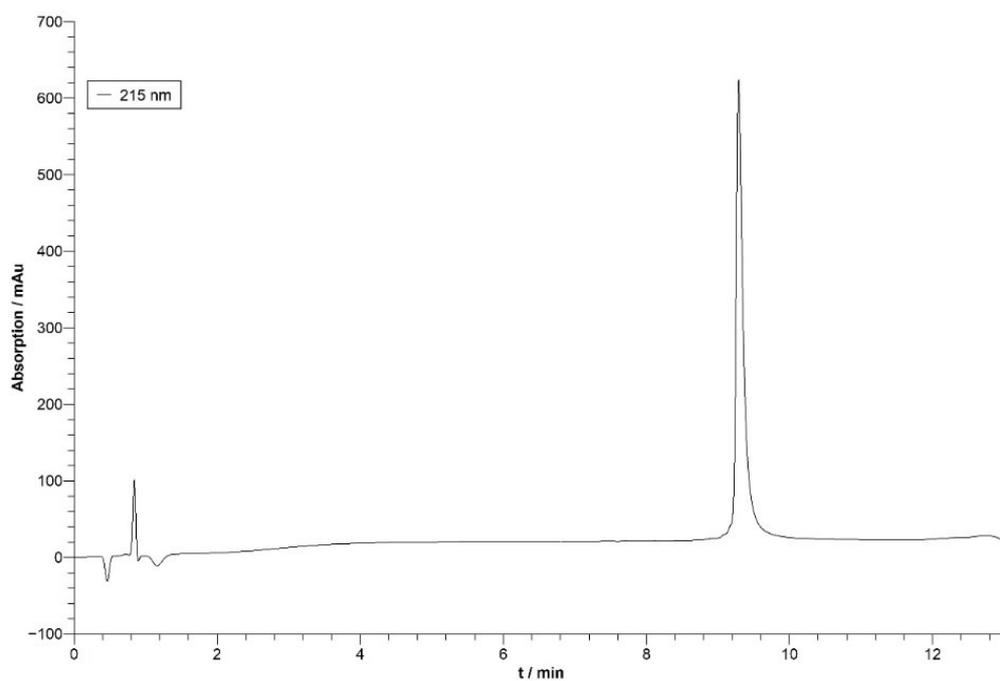
| Aminosäure | $\delta(\text{NH})$ / ppm | $\delta(\alpha)$ / ppm | $\delta(\beta)$ / ppm | $\delta(\gamma)$ / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|--|
| Pro ¹ | n.b. | 4.24 | 2.33, 1.81 | 1.98, 1.91 | 3.31 |
| Phe ² | n.b. | 4.64 | 3.25, 2.87 | - | δ : 7.19 ϵ, ζ : 7.46 |
| Gln ³ | 8.86 | 5.11 | 1.99, 1.84 | 2.36, 2.06 | ϵ : n.b. |
| Cys ⁴ | 9.14 | 4.46 | 3.25, 2.94 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.35 | 4.62 | 4.70 | 1.28 | - |
| Phe ⁶ | 8.85 | 4.29 | 2.54, 2.45 | - | δ : 6.95 ϵ, ζ : 7.29 |
| Hot ⁷ | 8.88 | 3.58 | 4.09 | 4.07 | δ : 5.04 |
| Tap ⁸ | - | 5.53 | 3.43, 3.01 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.13 | 4.15 | 4.16, 4.13 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.51 | 3.96, 3.88 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 7.96 | 3.94 | 1.64-1.52 | 1.46-1.41 | δ : 1.59-1.46 ϵ : 2.94 |
| Arg ¹² | 7.89 | 5.02 | 1.64, 1.52 | 1.52, 1.43 | δ : 3.10 ϵ : n.b. |
| Phe ¹³ | 8.68 | 4.79 | 3.40, 2.61 | - | δ : 7.18 ϵ : 6.91 ζ : 6.33 |
| Ser ¹⁴ | 7.19 | 4.58 | 4.24, 4.21 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 7.54 | 4.86 | 1.66-1.41 | 1.66-1.41 | δ : 1.03 |
| Asp ¹⁶ | 8.55 | 3.42 | 2.06, 2.00 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.49 | 4.10 | 3.27, 2.73 | - | δ : 7.15 ϵ, ζ : 7.33 |
| Asn ¹⁸ | 6.81 | 4.43 | 2.87, 2.81 | - | δ : n.b. |
| Leu ¹⁹ | 7.03 | 3.23 | 2.08, 1.19 | 1.59 | δ : 1.07-1.01 |
| Lys ²⁰ | 8.11 | 3.83 | 1.76-1.69 | 1.44-1.33 | δ : 1.76-1.58 ϵ : 3.19 |
| Thr ²¹ | 7.49 | 3.77 | 3.99 | 3.99 | - |
| His ²² | 7.36 | 4.18 | 3.16, 2.91 | - | δ^2 : 7.15 ϵ^1 : 7.97 |
| Val ²³ | 8.32 | 3.46 | 2.27 | 1.27 | - |
| Lys ²⁴ | 6.87 | 4.08 | 1.76-1.68 | 1.53-1.43 | δ : 1.76-1.66 |

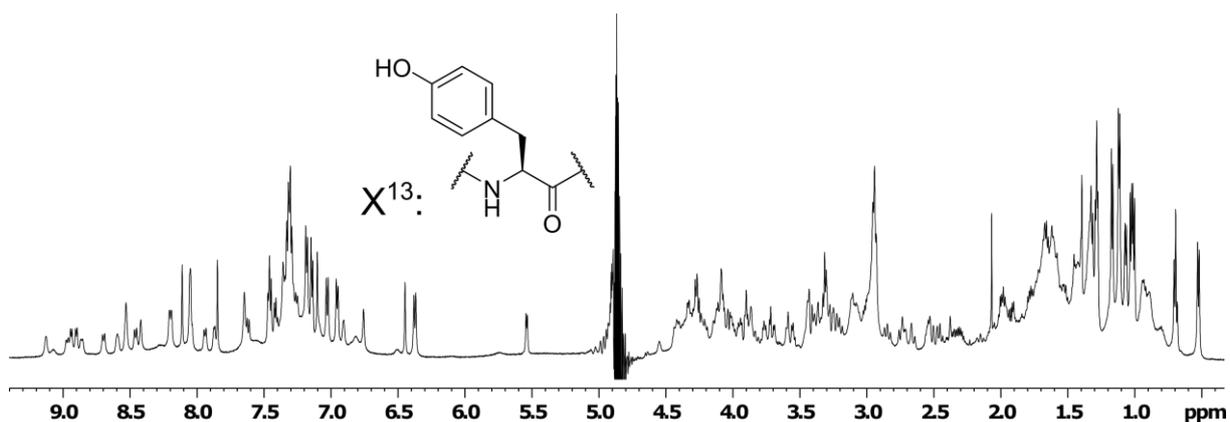
Experimenteller Teil

| | | | | | |
|-------------------|------|------------|------------|------------|--|
| Ile ²⁵ | 7.79 | 3.87 | 1.64 | 0.94, 0.85 | ϵ : 2.95 γ^{CH_3} : 0.53 |
| His ²⁶ | 7.20 | 4.38 | 2.48, 1.59 | - | δ : 0.69 δ^2 : 6.45 |
| Thr ²⁷ | 7.60 | 4.27 | 4.34 | 1.16 | ϵ^1 : 8.12 |
| Gly ²⁸ | 7.99 | 3.92, 3.70 | - | - | - |

HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₆H₂₂₄N₄₀O₃₉S₃] [M+4H]⁴⁺: 814.6486, gef.: 814.6481

rp-HPLC: tr = 9.29 min (10% - 40% MeCN in 10 min, 0.45 mL/min).



ZFV-2 (PXDI-004)


¹H-NMR: 600 MHz, 290K, H₂O/D₂O 9:1, 1.5 eq Zn²⁺, pH = 6.0, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

| Aminosäure | δ(NH) / ppm | δ(α) / ppm | δ(β) / ppm | δ(γ) / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|-------------|------------|------------|------------|--|
| Phe ² | 8.97 | 4.74 | 3.23, 2.84 | - | δ: 7.18 ε, ζ: 7.47 |
| Gln ³ | 8.86 | 5.03 | 1.98, 1.85 | 2.38, 2.07 | ε: n.b. |
| Cys ⁴ | 9.13 | 4.43 | 3.19, 2.94 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.46 | 4.64 | 4.64 | 1.28 | - |
| Phe ⁶ | 8.90 | 4.29 | 2.55, 2.43 | - | δ: 6.96 ε, ζ: 7.29 |
| Hot ⁷ | 8.94 | 3.57 | 4.09 | 4.07 | δ: 5.05 |
| Tap ⁸ | - | 5.54 | 3.42, 3.01 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.19 | 4.13 | 3.29 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.59 | 4.02, 3.85 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 8.05 | 3.92 | 1.67 | 1.44, 1.33 | δ: 1.57-1.50 ε: 2.93 |
| Arg ¹² | 7.94 | 5.06 | 1.62 | 1.52, 1.41 | δ: 3.08 ε: n.b. |
| Tyr ¹³ | 8.70 | 4.74 | 3.37, 2.53 | - | δ: 7.03 ε: 6.37 |
| Ser ¹⁴ | n.b. | n.b. | n.b. | - | - |
| Leu ¹⁵ | 7.64 | 4.82 | 1.64-1.55 | 1.39 | δ: 1.01 |
| Asp ¹⁶ | 8.52 | 3.44 | 1.93 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.53 | 4.11 | 3.26, 2.74 | - | δ: 7.14 ε, ζ: 7.36-7.26 |
| Asn ¹⁸ | 6.82 | 4.42 | 2.76-2.61 | - | δ: n.b. |
| Leu ¹⁹ | 7.18 | 3.09 | 1.61, 1.52 | 1.53 | δ: 1.39 |
| Lys ²⁰ | 8.21 | 3.86 | 1.74 | 1.46, 1.36 | δ: 1.72, 1.56 ε: 2.95 |
| Thr ²¹ | 7.46 | 3.77 | 4.00 | 1.11 | - |
| His ²² | 7.35 | 4.21 | 3.37, 3.09 | - | δ ² : 7.10 ε ¹ : 7.85 |
| Val ²³ | 8.42 | 3.43 | 2.29 | 1.31, 1.29 | - |
| Lys ²⁴ | 6.91 | 4.08 | 1.85-1.65 | 1.58-1.42 | δ: 1.85-1.65 ε: 2.93 |
| Ile ²⁵ | 7.87 | 3.90 | 1.67 | 0.94, 0.80 | γ ^{CH₃} : 0.52 δ: 0.70 |
| His ²⁶ | 7.25 | 4.39 | 2.49, 1.59 | - | δ ² : 6.45 ε ¹ : 8.11 |
| Thr ²⁷ | 7.62 | 4.25 | 4.31 | 1.17 | - |

Gly²⁸

8.04

3.71, 3.92

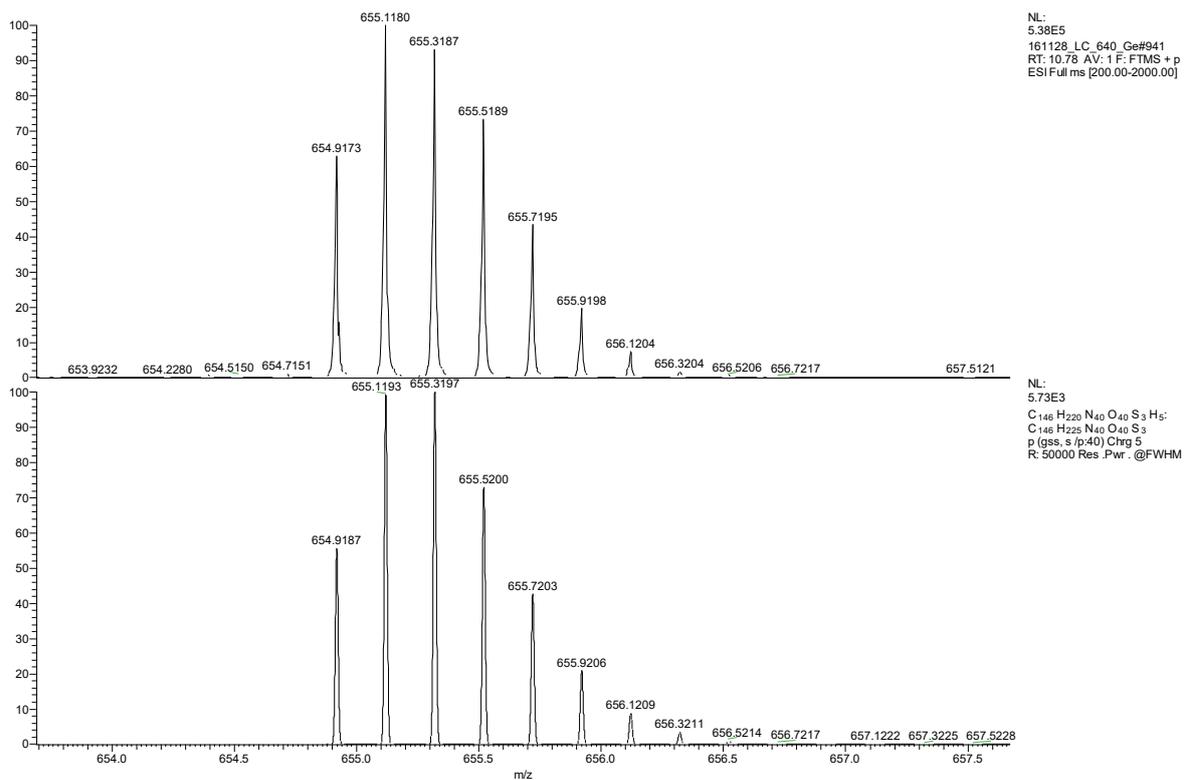
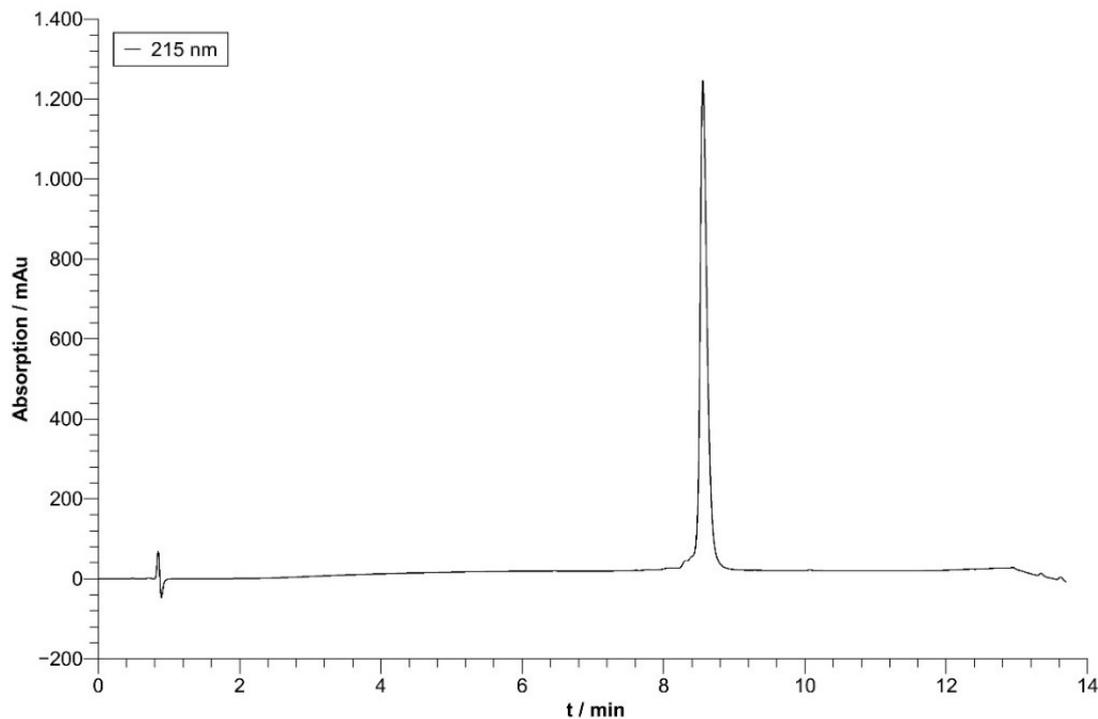
-

-

-

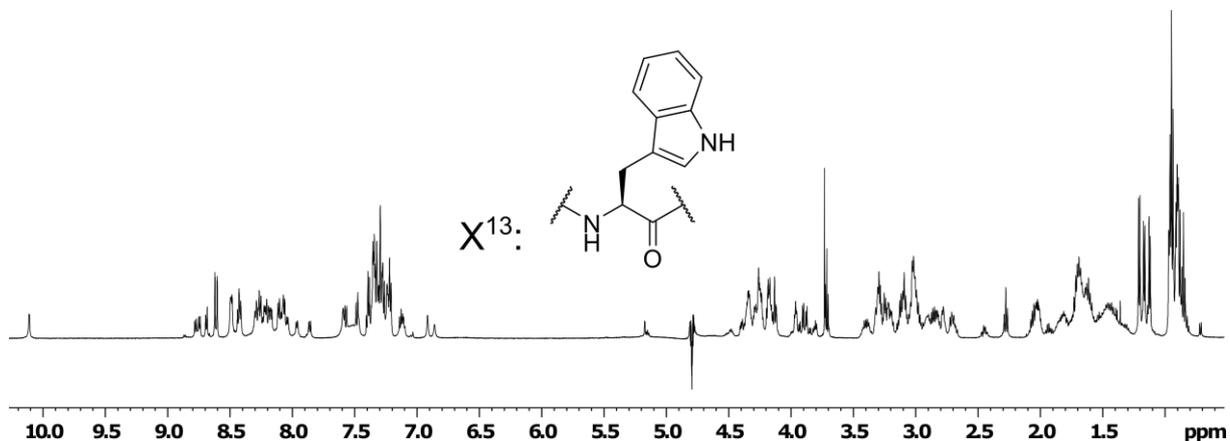
HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₆H₂₂₅N₄₀O₄₀S₃] [M+5H]⁵⁺: 655.1193, gef.: 655.1180

rp-HPLC: tr = 8.55 min (10% - 40% MeCN in 10 min, 0.45 mL/min).



ZFV-3 (PXDI-001)

Das Ersetzen von Phenylalanin an Position 13 durch Tryptophan führt nach Zugabe von Zink zu einer Teilfaltung. Gewisse Merkmale einer klassischen Zinkfingerfaltung können im $^1\text{H-NMR}$ bei 280K erkannt werden. Jedoch konnte bei dieser Temperatur keine aussagekräftigen 2D-Spektren erhalten werden. Dadurch kann keine Zuordnung der Struktur in diesem Zustand durchgeführt werden. Die Struktur wurde in Abwesenheit von Zink charakterisiert (*apo*).



$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 300K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH = 3.2, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

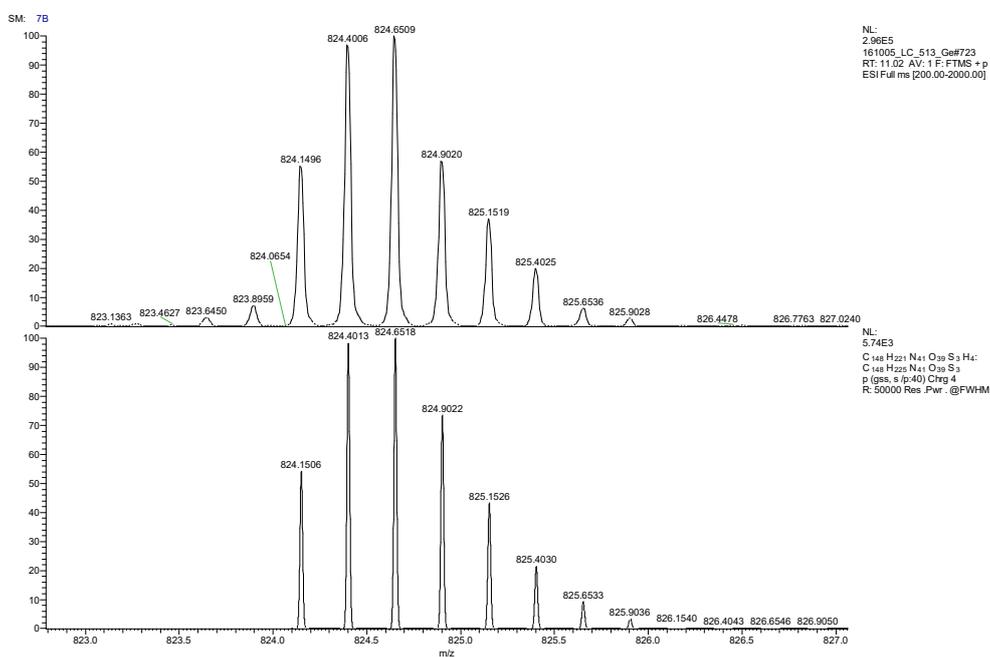
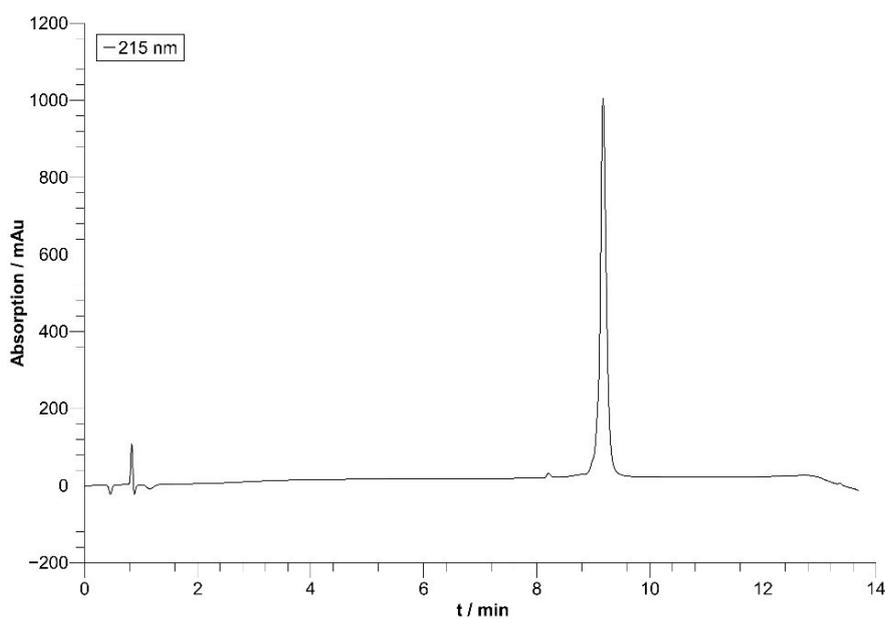
| Aminosäure | $\delta(\text{NH})$ / ppm | $\delta(\alpha)$ / ppm | $\delta(\beta)$ / ppm | $\delta(\gamma)$ / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|---|
| Phe ² | 8.74 | 4.67 | 3.09 | - | δ : 7.17 ϵ, ζ : 7.23 |
| Gln ³ | 8.42 | 4.33 | 2.02, 1.92 | 2.27 | ϵ : 7.46, 6.86 |
| Cys ⁴ | 8.43 | 4.49 | 2.85 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.18 | 4.34 | 4.19 | 1.13 | - |
| Phe ⁶ | 8.17 | 4.77 | 3.21, 2.99 | - | δ : 7.27 ϵ, ζ : 7.36 |
| Hot ⁷ | 8.77 | 4.13 | 4.25 | 4.24 | δ : 5.18 |
| Tap ⁸ | - | 5.15 | 3.28 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.42 | 4.48 | 3.02, 2.96 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.49 | 3.95 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 8.08 | 4.25 | 1.69 | 1.49 | δ : 1.57 ϵ : 3.02 |
| Arg ¹² | 8.28 | 4.26 | 1.69 | 1.46 | δ : 3.09 ϵ : 7.11 |
| W ¹³ | 8.11 | 4.67 | 3.30, 3.24 | - | δ^1 : 7.24 ϵ^1 : 10.11 ϵ^3 : 7.48 ζ^2 : 7.57 ζ^3 : 7.23 η^2 : 7.13 |
| Ser ¹⁴ | 7.96 | 4.33 | 3.81, 3.71 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 8.06 | 4.25 | 1.65 | 1.30 | δ : 0.93 |
| Asp ¹⁶ | 8.21 | 4.61 | 2.79, 2.68 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.06 | 4.51 | 3.10, 3.01 | - | δ : 7.21 ϵ, ζ : 7.33 |
| Asn ¹⁸ | 8.29 | 4.63 | 2.84, 2.71 | - | δ : 7.59, 6.91 |
| Leu ¹⁹ | 8.04 | 4.27 | 1.65 | 1.58 | δ : 0.90 |
| Lys ²⁰ | 8.26 | 4.39 | 1.82 | 1.44 | δ : 1.68 ϵ : 3.00 |
| Thr ²¹ | 7.86 | 4.29 | 4.17 | 1.17 | - |
| His ²² | 8.49 | 4.74 | 3.30, 3.20 | - | δ^2 : 7.29 |

Experimenteller Teil

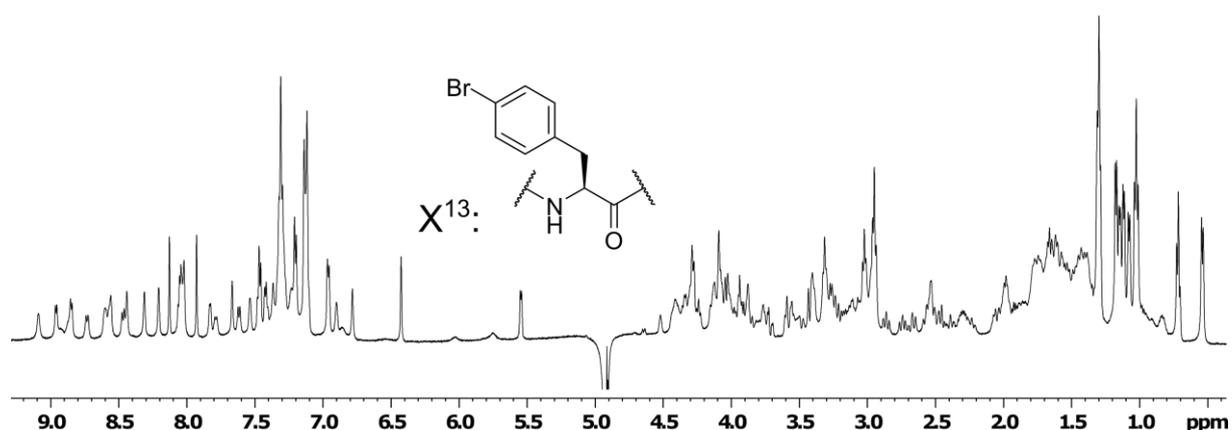
| | | | | | | |
|-------------------|------|------|------|------|---|-------------------------------|
| Val ²³ | 8.11 | 4.12 | 2.05 | 0.93 | - | ϵ^1 : 8.60 |
| Lys ²⁴ | 8.49 | 4.36 | 1.78 | 1.43 | - | δ : 1.72 |
| Ile ²⁵ | 8.19 | 4.19 | 1.82 | 1.44 | - | ϵ : 3.02 |
| His ²⁶ | 8.69 | 4.81 | 3.26 | - | - | γ^{CH_3} : 0.88 |
| Thr ²⁷ | 8.26 | 4.39 | 4.24 | 1.20 | - | δ^2 : 7.32 |
| Gly ²⁸ | 8.22 | 3.89 | - | - | - | ϵ^1 : 8.62 |

HPLC-MS (ESI+): ber. für $[\text{C}_{148}\text{H}_{225}\text{N}_{41}\text{O}_{39}\text{S}_3]$ $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$: 824.6518, gef.: 824.6509

rp-HPLC: tr = 9.17 min (10% - 40% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



ZFV-4 (PXDI-044)



$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 290K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, 1.5 eq Zn^{2+} , pH = 6.0, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

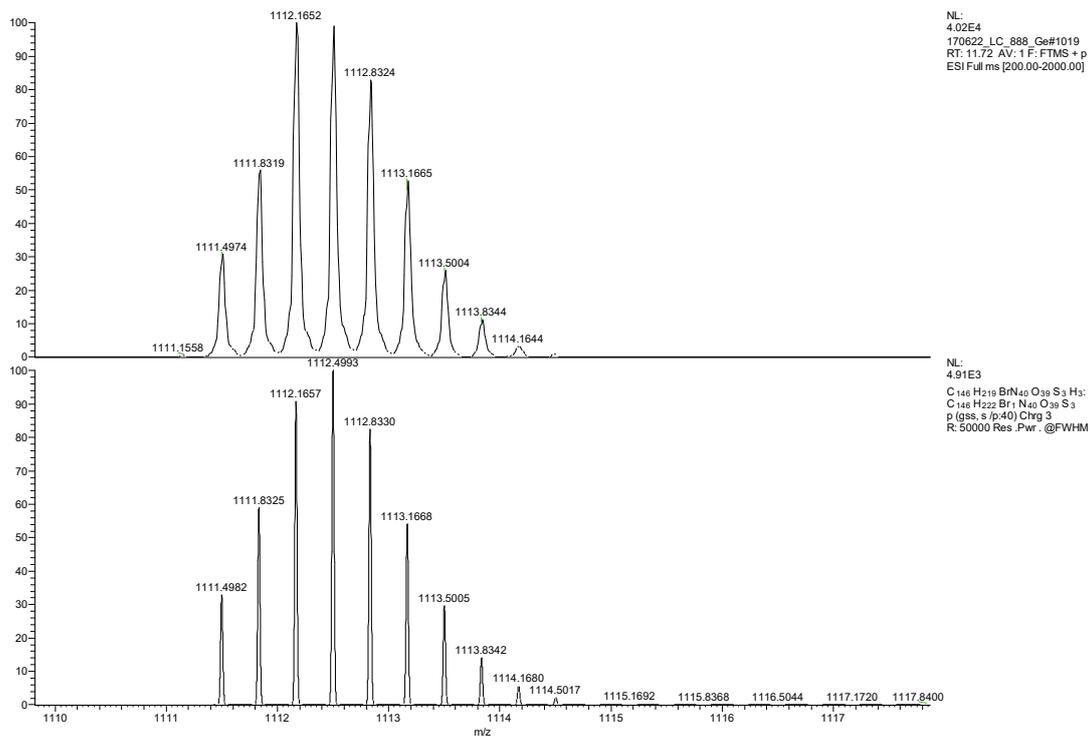
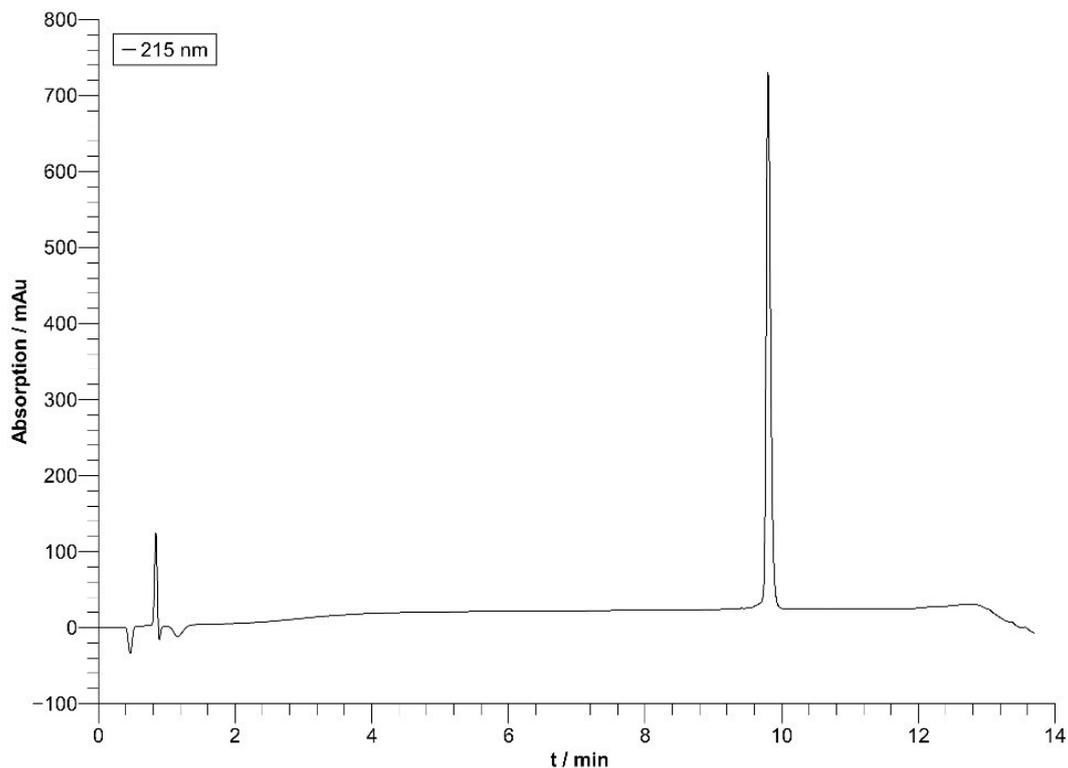
| Aminosäure | $\delta(\text{NH})$ / ppm | $\delta(\alpha)$ / ppm | $\delta(\beta)$ / ppm | $\delta(\gamma)$ / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|--|
| Pro ¹ | n.b. | 4.24 | 2.32, 2.26 | 2.00, 1.76 | δ : 3.32 |
| Phe ² | 8.92 | 3.58 | 3.24, 2.86 | - | δ : 7.20 ϵ, ζ : 7.45 |
| Gln ³ | 8.87 | 4.91 | 2.00, 1.84 | 2.39, 2.01 | ϵ : |
| Cys ⁴ | 9.09 | 4.43 | 3.21, 2.97 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.47 | 4.65 | 4.65 | 1.30 | - |
| Phe ⁶ | 8.85 | 4.27 | 2.53, 2.46 | - | δ : 6.92 ϵ, ζ : 7.30 |
| Hot ⁷ | 8.96 | 3.58 | 4.09 | 4.07 | δ : 5.07 |
| Tap ⁸ | - | 5.55 | 3.42, 3.02 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.21 | 4.14 | 3.30 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.60 | 4.03, 3.87 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 8.03 | 4.01 | 1.60-1.52 | 1.44-1.40 | δ : 1.66-1.60 ϵ : 3.02 |
| Arg ¹² | 8.03 | 5.05 | 1.62 | 1.41 | δ : 3.11 ϵ : n.b. |
| X ¹³ | 8.74 | 4.77 | 3.48, 2.56 | - | δ : 7.12 ϵ : 7.34 |
| Ser ¹⁴ | n.b. | n.b. | n.b. | - | - |
| Leu ¹⁵ | 7.79 | 3.93 | 1.65 | 1.43 | δ : 1.03 |
| Asp ¹⁶ | 8.56 | 3.53 | 1.98, 1.87 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.58 | 4.12 | 3.27, 2.74 | - | δ : 7.14 ϵ, ζ : 7.22 |
| Asn ¹⁸ | 6.86 | 4.41 | 2.63 | - | δ : n.b. |
| Leu ¹⁹ | 7.22 | 3.80 | 2.24, 2.02 | 1.38 | δ : 1.08 |
| Lys ²⁰ | 8.32 | 3.88 | 1.76, 1.59 | 1.47 | δ : 1.58 ϵ : 2.95 |
| Thr ²¹ | 7.54 | 3.76 | 3.98 | 1.12 | - |
| His ²² | 7.24 | 4.30 | 3.40, 3.15 | - | δ^2 : 7.13 ϵ^1 : 7.94 |
| Val ²³ | 8.45 | 3.40 | 2.28 | 1.31 | - |
| Lys ²⁴ | 6.90 | 4.08 | 1.75 | 1.42 | δ : 1.67, 1.56 ϵ : 2.95 |
| Ile ²⁵ | 7.83 | 3.94 | 1.73 | 0.99, 0.83 | γ^{CH_3} : 0.54 δ : 0.72 |
| His ²⁶ | 7.28 | 4.38 | 2.51, 1.59 | - | δ^2 : 6.53 ϵ^1 : 8.13 |

Experimenteller Teil

| | | | | | |
|-------------------|------|------------|------|------|---|
| Thr ²⁷ | 7.62 | 4.29 | 4.34 | 1.17 | - |
| Gly ²⁸ | 8.05 | 3.93, 3.72 | - | - | - |

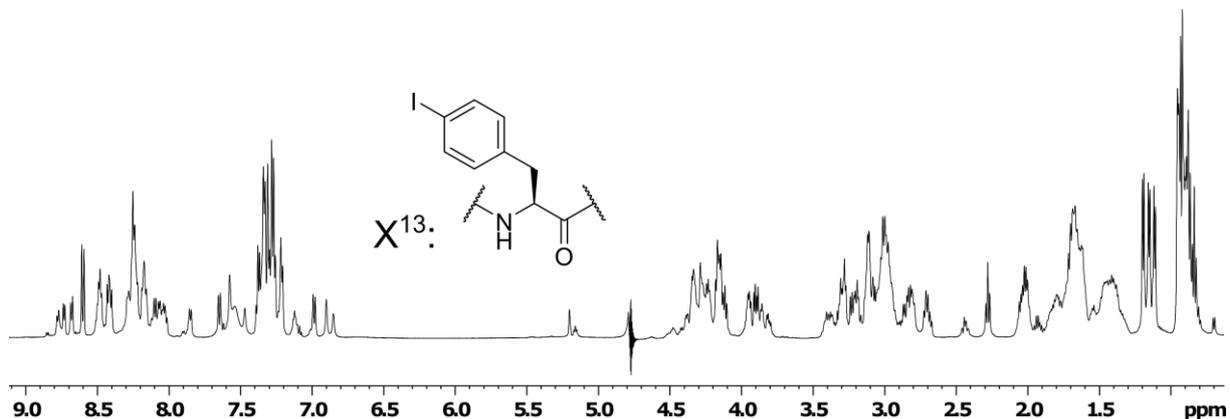
HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₆H₂₂₂Br₁N₄₀O₃₉S₃] [M+3H]³⁺: 1112.1657, gef.: 1112.1652

rp-HPLC: tr = 9.80 min (10% - 40% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



ZFV-5 (PXDI-003)

Das Ersetzen von Phenylalanin an Position 13 durch ζ -Iod-Phenylalanin führt nach Zugabe von Zink zu keiner definierten Struktur und starker Aggregation. Es kann daher keine Zuordnung der Struktur in diesem Zustand durchgeführt werden. Daher wurde die Struktur in Abwesenheit von Zink charakterisiert (*apo*).



$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 300K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH = 3.7, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

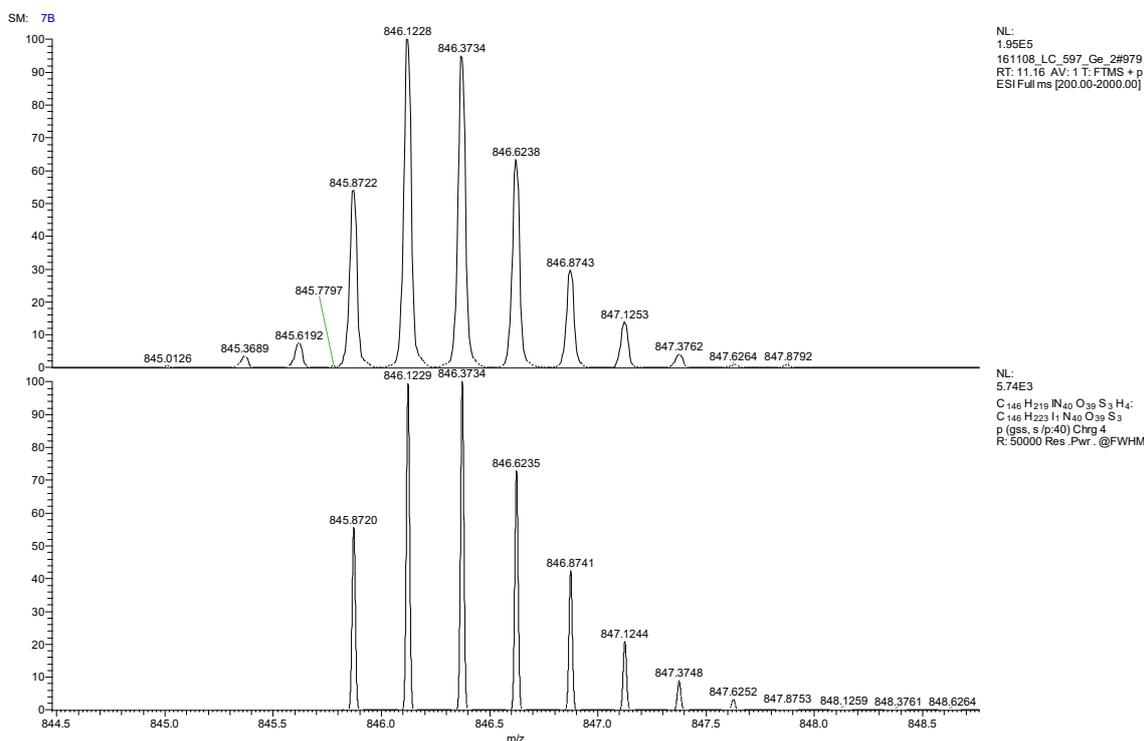
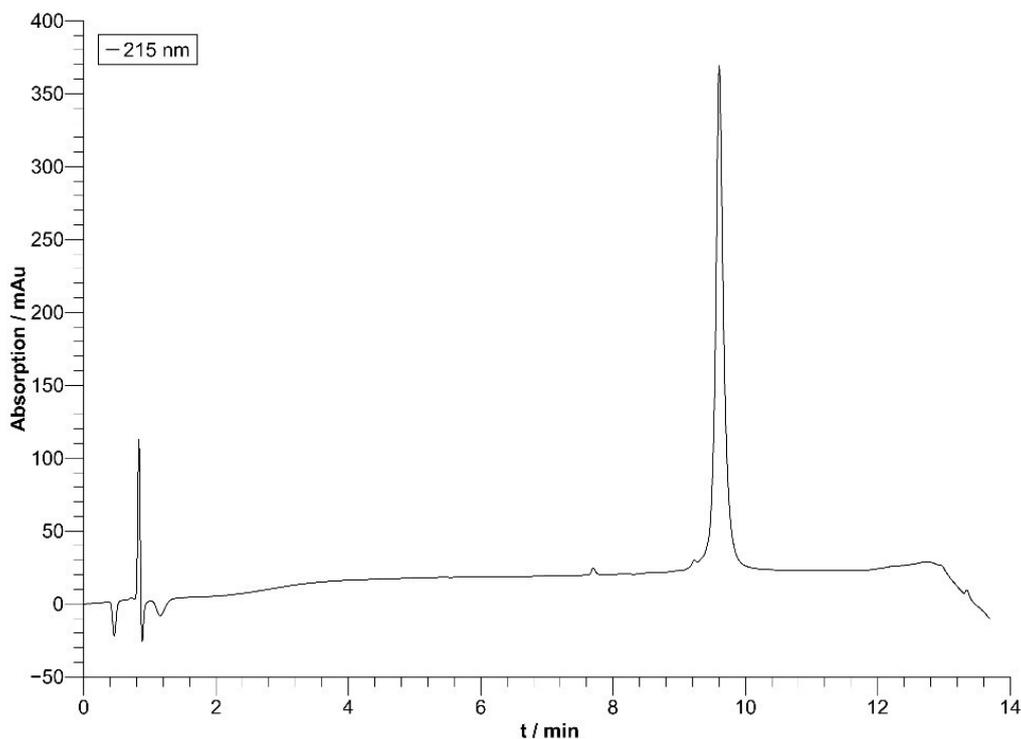
| Aminosäure | $\delta(\text{NH})$ / ppm | $\delta(\alpha)$ / ppm | $\delta(\beta)$ / ppm | $\delta(\gamma)$ / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|---|
| Phe ² | 8.73 | 4.66 | 3.09 | - | δ : 7.12 ϵ, ζ : 7.32 |
| Gln ³ | 8.41 | 4.34 | 2.02, 1.91 | 2.27 | ϵ : 7.47, 6.85 |
| Cys ⁴ | 8.42 | 4.46 | 2.85 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.16 | 4.32 | 4.17 | 1.11 | - |
| Phe ⁶ | 8.17 | 4.33 | 3.19, 3.00 | - | δ : 7.26 ϵ, ζ : 7.35 |
| Hot ⁷ | 8.77 | 4.14 | 4.28 | 4.26 | δ : 5.20 |
| Tap ⁸ | - | 5.16 | 3.31 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.42 | 4.48 | 3.03-2.93 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.50 | 3.95 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 8.23 | 4.27 | 1.81 | 1.38 | δ : 1.71 ϵ : 2.90 |
| Arg ¹² | 8.23 | 4.24 | 1.67 | 1.46 | δ : 3.09 ϵ : 7.13 |
| X ¹³ | 8.22 | 4.37 | 3.08, 2.97 | - | δ : 6.98 ϵ : 7.65 |
| Ser ¹⁴ | 8.48 | 4.74 | 3.95 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 8.23 | 4.33 | 1.61 | 1.49 | δ : 0.90 |
| Asp ¹⁶ | 8.25 | 4.62 | 2.81, 2.70 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.06 | 4.51 | 3.09, 3.03 | - | δ : 7.33 ϵ, ζ : 7.26 |
| Asn ¹⁸ | 8.28 | 4.62 | 2.82, 2.69 | - | δ : 7.57, 6.89 |
| Leu ¹⁹ | 8.04 | 4.24 | 1.63 | 1.59 | δ : 0.90 |
| Lys ²⁰ | 8.25 | 4.29 | 1.78 | 1.46 | δ : 1.67 ϵ : 3.11 |
| Thr ²¹ | 7.85 | 4.28 | 4.15 | 1.15 | - |
| His ²² | 8.48 | 3.95 | 3.29, 3.19 | - | δ^2 : 7.29 ϵ^1 : 8.59 |
| Val ²³ | 8.09 | 4.11 | 2.04 | 0.92 | - |
| Lys ²⁴ | 8.47 | 4.34 | 1.77 | 1.40 | δ : 1.70 ϵ : 2.99 |
| Ile ²⁵ | 8.18 | 4.17 | 1.80 | 1.43 | γ^{CH_3} : 0.86 |

Experimenteller Teil

| | | | | | |
|-------------------|------|------|------------|------|---|
| His ²⁶ | 8.68 | 4.81 | 3.29, 3.20 | - | δ: 0.86 δ ² : 7.30 ε ¹ : 8.61 |
| Thr ²⁷ | 8.24 | 4.37 | 4.22 | 1.20 | - |
| Gly ²⁸ | 8.25 | 3.90 | - | - | - |

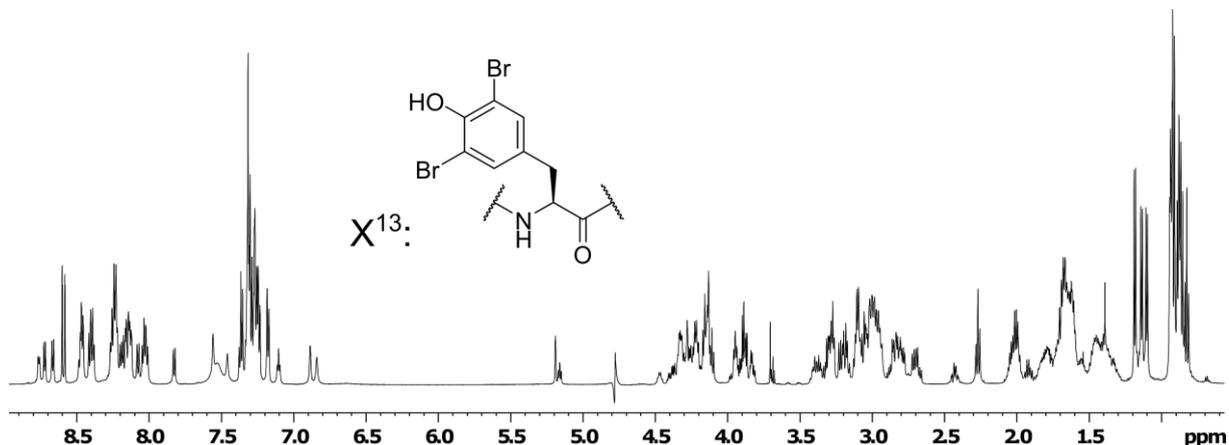
HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₆H₂₂₃IN₄₀O₃₉S₃] [M+4H]⁴⁺: 846.1229, gef.: 846.1228

rp-HPLC: tr = 9.60 min (10% - 40% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



ZFV-6 (PXDI-037)

Das Ersetzen von Phenylalanin an Position 13 durch ϵ -Di-Bromo-Tyrosin führt nach Zugabe von Zink zu keiner definierten Struktur. Eine Erhöhung des pH-Wertes resultierte in Aggregation. Es konnte daher keine Zuordnung der Struktur in diesem Zustand durchgeführt werden. Aus diesem Grunde wurde die Struktur in Abwesenheit von Zink charakterisiert (*apo*).



$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 300K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH = 3.2, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

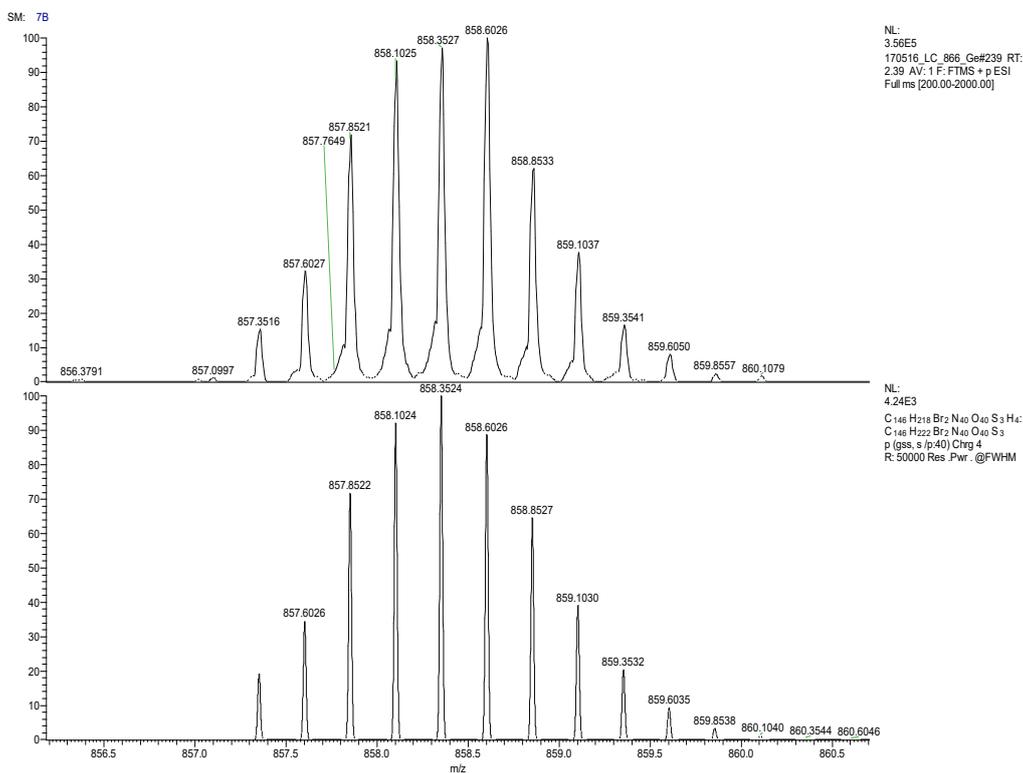
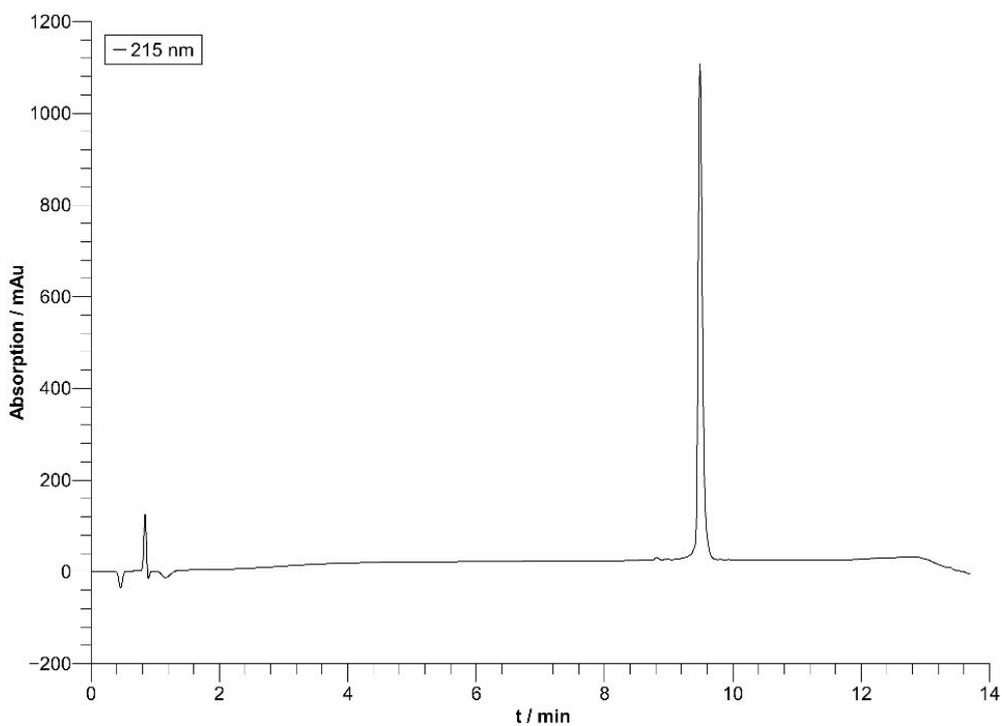
| Aminosäure | $\delta(\text{NH})$ / ppm | $\delta(\alpha)$ / ppm | $\delta(\beta)$ / ppm | $\delta(\gamma)$ / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|---|
| Pro ¹ | n.b. | 4.33 | 2.42, 2.26 | 2.00 | δ : 3.38 |
| Phe ² | 8.72 | 4.65 | 3.07 | - | δ : 7.18 ϵ, ζ : 7.28 |
| Gln ³ | 8.39 | 4.34 | 2.00, 1.91 | 2.27 | ϵ : 7.45, 6.84 |
| Cys ⁴ | 8.41 | 4.47 | 2.84 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.14 | 4.34 | 4.29 | 1.10 | - |
| Phe ⁶ | 8.14 | 4.33 | 3.19, 2.98 | - | δ : 7.24 ϵ, ζ : 7.31 |
| Hot ⁷ | 8.76 | 4.13 | 4.28 | 4.26 | δ : 5.19 |
| Tap ⁸ | - | 5.16 | 3.30 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.39 | 4.46 | 3.02, 2.95 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.47 | 3.95 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 8.04 | 4.22 | 1.71 | 1.33 | δ : 1.65 ϵ : 3.00 |
| Arg ¹² | 8.19 | 4.20 | 1.67 | 1.46 | δ : 3.11 ϵ : 7.10 |
| X ¹³ | 8.12 | 4.57 | 3.02, 2.83 | - | δ : 7.31 ζ -OH: n.b. |
| Ser ¹⁴ | 8.13 | 4.41 | 3.89, 3.83 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 8.26 | 4.29 | 1.62 | 1.54 | δ : 0.91 |
| Asp ¹⁶ | 8.24 | 4.61 | 2.80, 2.70 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.02 | 4.47 | 3.06 | - | δ : 7.18 ϵ, ζ : 7.28 |
| Asn ¹⁸ | 8.25 | 4.61 | 2.81, 2.69 | - | δ : 6.89, 7.56 |
| Leu ¹⁹ | 8.01 | 4.24 | 1.68 | 1.58 | δ : 0.93, 0.87 |
| Lys ²⁰ | 8.22 | 4.21 | 1.80 | 1.43 | δ : 1.67 ϵ : 2.98 |
| Thr ²¹ | 7.82 | 4.27 | 4.15 | 1.14 | - |
| His ²² | 8.46 | 4.71 | 3.28, 3.18 | - | δ^2 : 7.27 ϵ^1 : 8.58 |
| Val ²³ | 8.07 | 4.10 | 2.03 | 0.91 | - |
| Lys ²⁴ | 8.46 | 4.34 | 1.77 | 1.40 | δ : 1.71 ϵ : 3.00 |

Experimenteller Teil

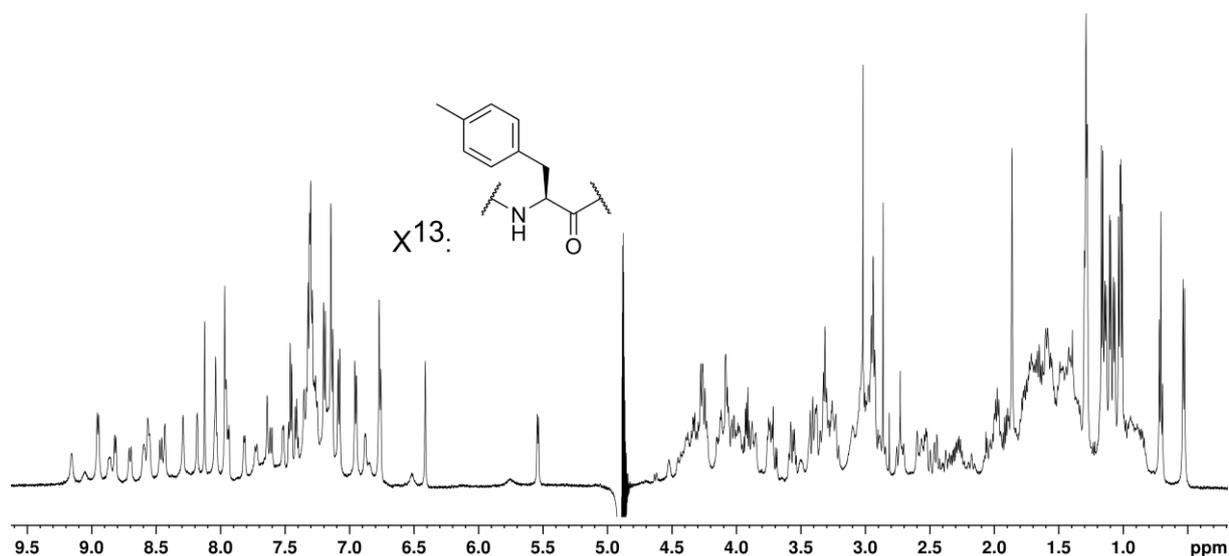
| | | | | | |
|-------------------|------|------|------|------|-------------------------------|
| Ile ²⁵ | 8.17 | 4.16 | 1.80 | 1.15 | γ^{CH_3} : 0.86 |
| His ²⁶ | 8.66 | 4.80 | 3.24 | - | δ^2 : 7.29 |
| Thr ²⁷ | 8.23 | 4.38 | 4.30 | 1.19 | ϵ^1 : 8.60 |
| Gly ²⁸ | 8.22 | 3.88 | - | - | - |

HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₆H₂₂₂Br₂N₄₀O₄₀S₃] [M+4H]⁴⁺: 858.3524, gef.: 858.3527

rp-HPLC: tr = 9.50 min (10% - 40% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



ZFV-7 (PXDI-054)



¹H-NMR: 600 MHz, 290K, H₂O/D₂O 9:1, 1.5 eq Zn²⁺, pH = 6.0, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

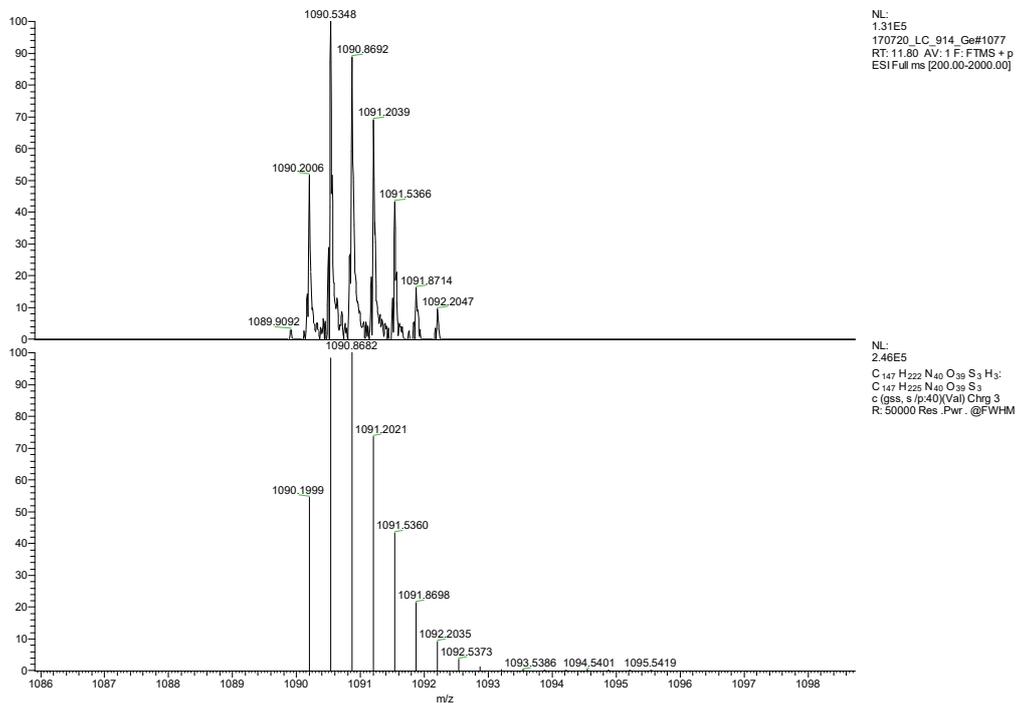
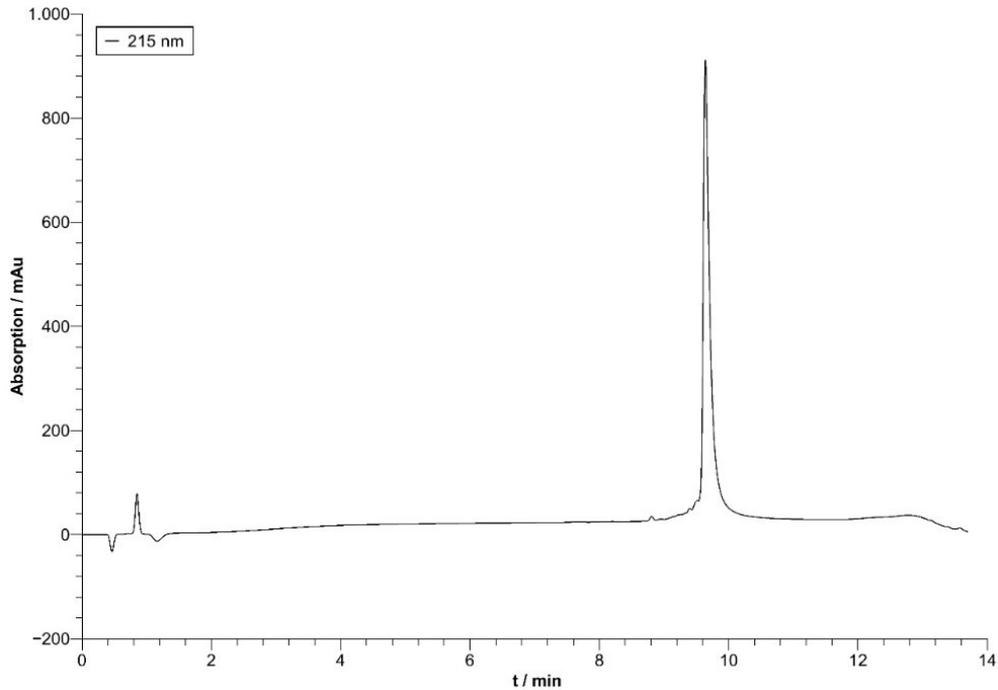
| Aminosäure | δ(NH) / ppm | δ(α) / ppm | δ(β) / ppm | δ(γ) / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|-------------|------------|------------|------------|--|
| Pro ¹ | n.b. | 4.26 | 2.33, 1.78 | 2.00, 1.91 | δ: 3.33 |
| Phe ² | 8.95 | 4.78 | 3.25, 2.87 | - | δ: 7.20 ε, ζ: 7.45 |
| Gln ³ | 8.84 | 5.00 | 2.00, 1.84 | 2.38, 2.05 | ε: n.b. |
| Cys ⁴ | 9.14 | 4.45 | 3.24, 2.97 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.44 | 4.62 | 4.64 | 1.29 | - |
| Phe ⁶ | 8.82 | 4.29 | 2.53, 2.45 | - | δ: 6.96 ε, ζ: 7.30 |
| Hot ⁷ | 8.94 | 3.59 | 4.10 | 4.10 | δ: 5.06 |
| Tap ⁸ | - | 5.55 | 3.43, 3.02 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.17 | 4.14 | 3.29 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.59 | 4.00, 3.87 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 7.95 | 4.01 | 1.59 | 1.47, 1.38 | δ: 1.49 ε: 2.88 |
| Arg ¹² | 7.94 | 5.08 | 1.56 | 1.41 | δ: 3.09 ε: 7.18 |
| X ¹³ | 8.70 | 4.72 | 3.43, 2.57 | - | δ: 7.08 ε: 6.77 ζ-Me: 1.87 |
| Ser ¹⁴ | n.b. | 4.53 | 4.07, 4.04 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 7.72 | n.b. | 1.64 | 1.44 | δ: 1.05 |
| Asp ¹⁶ | 8.57 | 3.51 | 1.98 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.53 | 4.12 | 3.27, 2.75 | - | δ: 7.15 ε, ζ: 7.32 |
| Asn ¹⁸ | 6.86 | 4.40 | 2.72, 2.59 | - | δ: n.b. |
| Leu ¹⁹ | 7.15 | 3.74 | 2.17 | 1.40 | δ: 1.07 |
| Lys ²⁰ | 8.28 | 3.87 | 1.76 | 1.42 | δ: 1.58 ε: 2.95 |
| Thr ²¹ | 7.50 | 3.76 | 3.98 | 1.12 | - |
| His ²² | 7.28 | 4.25 | 3.35, 2.89 | - | δ ² : 7.16 ε ¹ : 7.98 |
| Val ²³ | 8.42 | 3.39 | 2.27 | 1.30 | - |
| Lys ²⁴ | 6.88 | 4.07 | 1.75 | 1.55, 1.42 | δ: 1.70 |

Experimenteller Teil

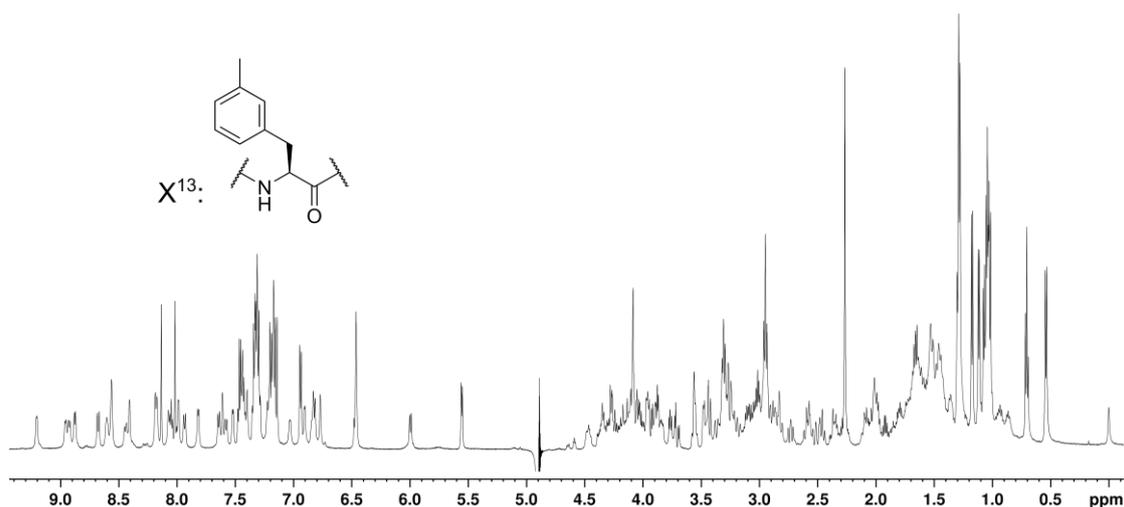
| | | | | | |
|-------------------|------|------------|------|------|--|
| Ile ²⁵ | 7.81 | 3.94 | 1.72 | 0.86 | ϵ : 2.95 γ^{CH_3} : 0.54 |
| His ²⁶ | 7.27 | 4.39 | 1.72 | - | δ : 0.71 δ^2 : 6.42 |
| Thr ²⁷ | 7.61 | 4.28 | 4.34 | 1.17 | ϵ^1 : 8.13 |
| Gly ²⁸ | 8.03 | 3.92, 3.72 | - | - | - |

HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₇H₂₂₅N₄₀O₃₉S₃] [M+3H]³⁺: 1090.8682, gef.: 1090.8692

rp-HPLC: tr = 9.64 min (10% - 40% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



ZFV-8 (PXDI-087)



$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 290K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, 1.5 eq Zn^{2+} , pH = 6.8, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

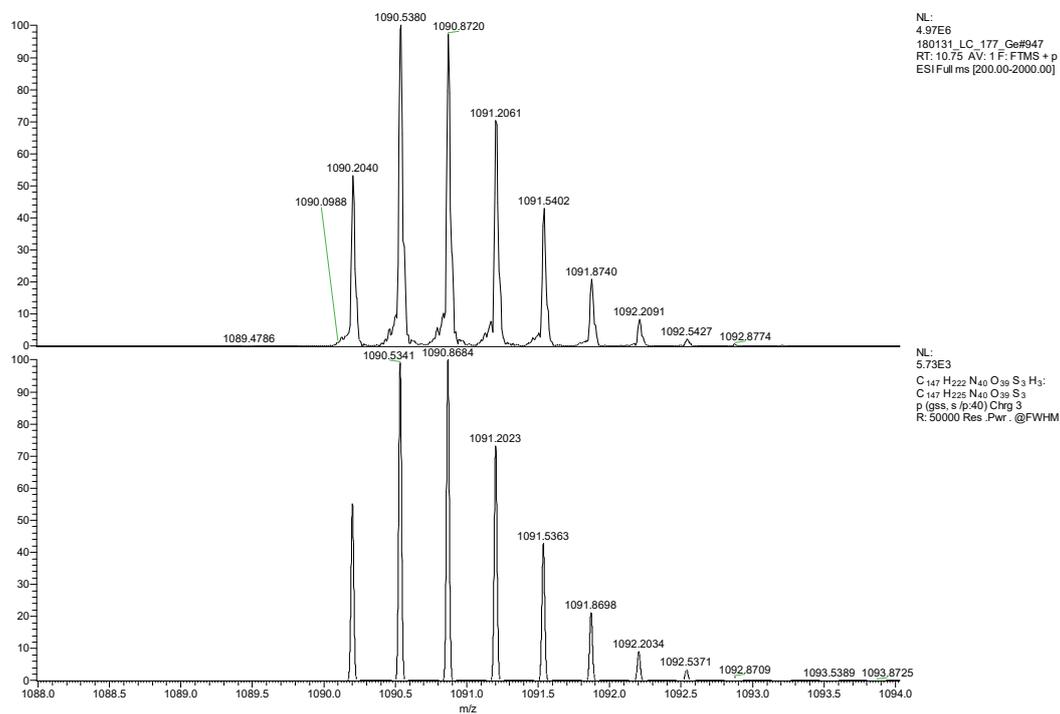
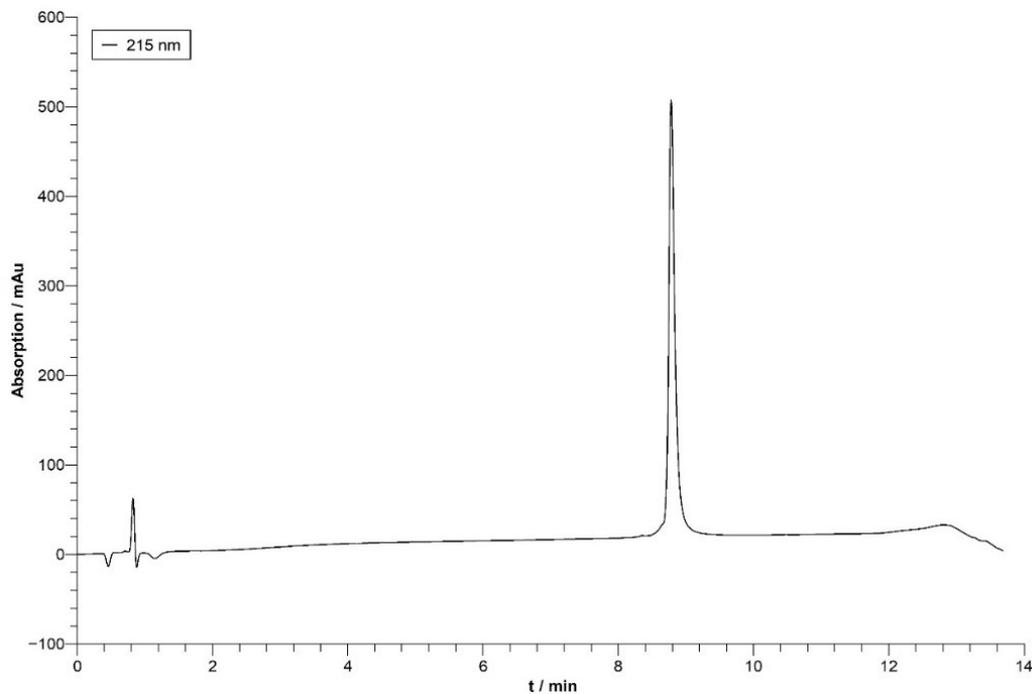
| Aminosäure | $\delta(\text{NH})$ / ppm | $\delta(\alpha)$ / ppm | $\delta(\beta)$ / ppm | $\delta(\gamma)$ / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|---|
| Pro ¹ | n.b. | 4.24 | 2.35, 1.97 | 1.92, 1.80 | δ : 3.31 |
| Phe ² | n.b. | 4.81 | 3.26, 2.91 | - | δ : 7.20 ϵ, ζ : n.b. |
| Gln ³ | 8.92 | 5.11 | 2.00, 1.85 | 2.37, 2.08 | ϵ : n.b. |
| Cys ⁴ | 9.21 | 4.48 | 3.27, 2.97 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.44 | 4.64 | 4.64 | 1.29 | - |
| Phe ⁶ | 8.88 | 4.30 | 2.58, 2.46 | - | δ : 6.94 ϵ, ζ : 7.31 |
| Hot ⁷ | 8.96 | 3.56 | 4.09 | 4.09 | δ : 5.06 |
| Tap ⁸ | - | 5.56 | 3.43, 3.01 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.19 | 4.16 | 3.31 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.60 | 3.98, 3.89 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 7.99 | 3.96 | 1.51 | 1.37, 1.27 | δ : 1.45 ϵ : 3.03 |
| Arg ¹² | 7.93 | 5.03 | 1.65 | 1.52, 1.44 | δ : 3.09 ϵ : n.b. |
| X ¹³ | 8.68 | 4.79 | 3.37, 2.61 | - | δ^1 : 7.18 δ^2 : 6.82 ϵ^1 -Me: 2.26 ϵ^2 : 6.47 ζ : 6.00 |
| Ser ¹⁴ | n.b. | 4.60 | 4.07 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 7.58 | 4.87 | 1.68, 1.62 | 1.46 | δ : 1.04 |
| Asp ¹⁶ | 8.57 | 3.45 | 2.03 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.56 | 4.12 | 3.29, 2.73 | - | δ : 7.17 ϵ, ζ : 7.33 |
| Asn ¹⁸ | 6.84 | 4.47 | 2.87, 2.84 | - | δ : 7.61, 6.77 |
| Leu ¹⁹ | 7.03 | 3.23 | 2.10, 1.23 | 1.62 | δ : 1.07, 1.04 |
| Lys ²⁰ | 8.17 | 3.84 | 1.73 | 1.35 | δ : 1.57, 1.47 ϵ : 2.95 |
| Thr ²¹ | 7.52 | 3.77 | 4.03 | 1.12 | - |
| His ²² | 7.44 | 4.19 | 3.20, 2.85 | - | δ^2 : 7.14 ϵ^1 : 8.02 |
| Val ²³ | 8.41 | 3.48 | 2.28 | 1.29 | - |
| Lys ²⁴ | 6.91 | 4.10 | 1.76 | 1.56, 1.42 | δ : 1.67 |

Experimenteller Teil

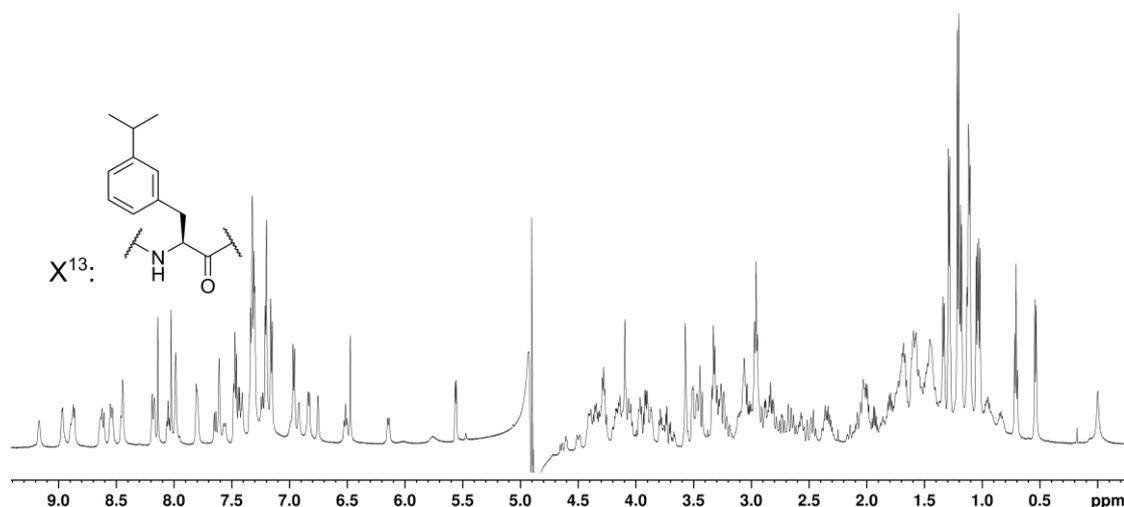
| | | | | | |
|-------------------|------|------------|------------|------------|--|
| Ile ²⁵ | 7.82 | 3.88 | 1.66 | 0.94, 0.87 | ϵ : 2.95 γ^{CH_3} : 0.54 |
| His ²⁶ | 7.22 | 4.37 | 2.52, 1.52 | - | δ : 0.71 δ^2 : 6.46 |
| Thr ²⁷ | 7.64 | 4.27 | 4.35 | 1.18 | ϵ^1 : 8.14 |
| Gly ²⁸ | 8.05 | 3.93, 3.71 | - | - | - |

HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₇H₂₂₅N₄₀O₃₉S₃] [M+3H]³⁺: 1090.8684, gef.: 1090.8720

rp-HPLC: tr = 8.78 min (10% - 40% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



ZFV-9 (PXDI-227)



$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 290K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, 1.5 eq Zn^{2+} , pH = 6.0, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

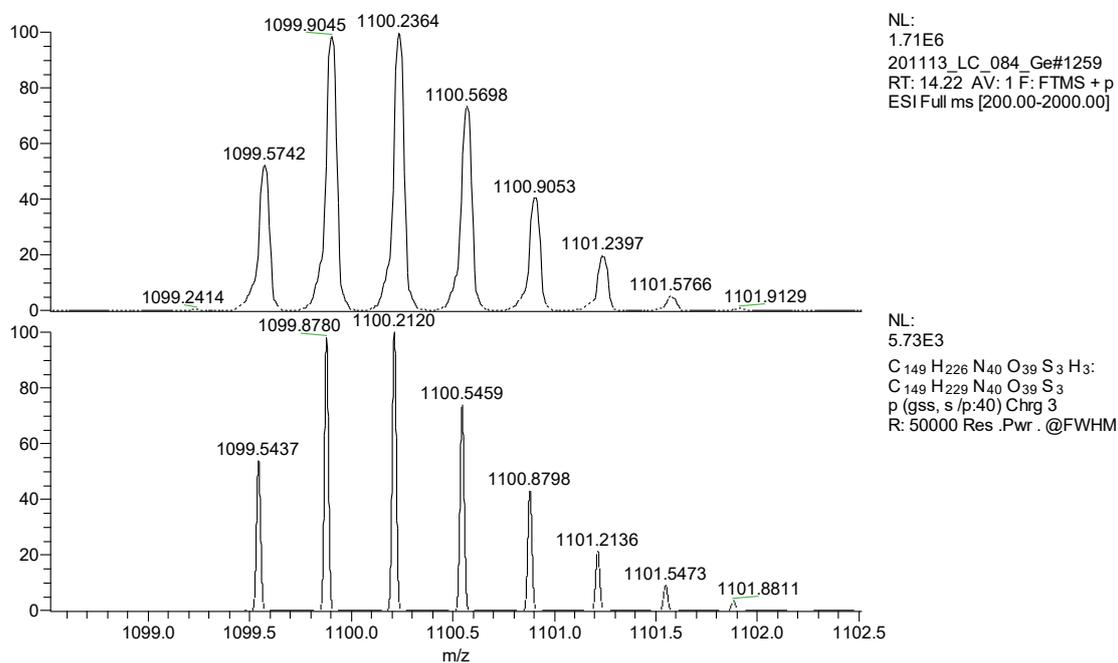
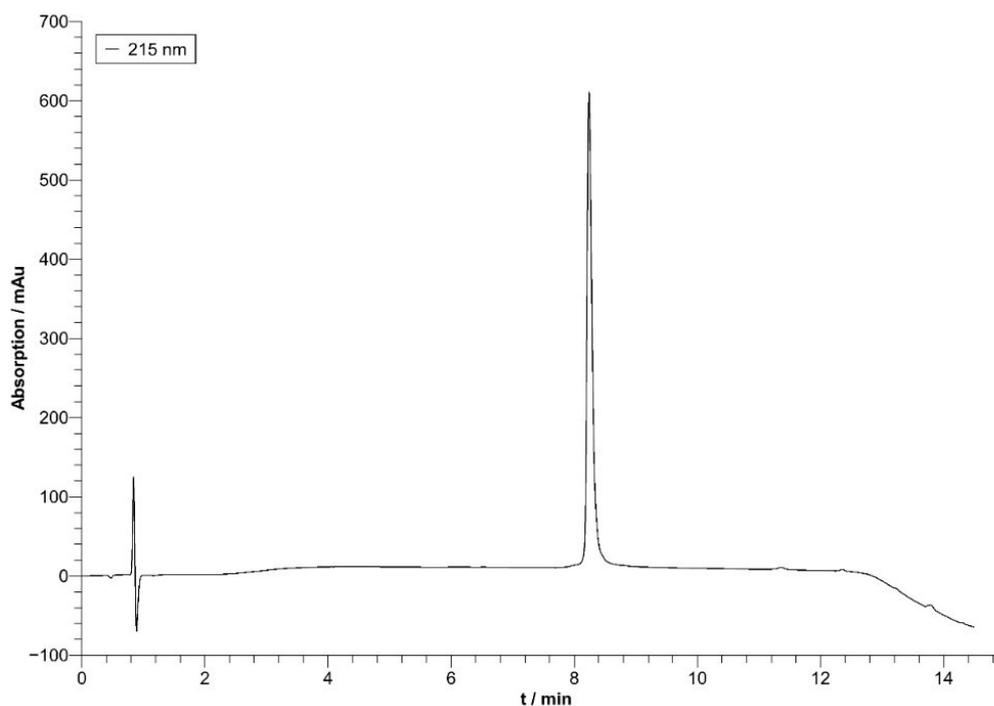
| Aminosäure | $\delta(\text{NH})$ / ppm | $\delta(\alpha)$ / ppm | $\delta(\beta)$ / ppm | $\delta(\gamma)$ / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|--|
| Pro ¹ | n.b. | 4.27 | 2.35, 1.99 | 1.96, 1.80 | δ : 3.33 |
| Phe ² | n.b. | 4.78 | 3.25, 2.92 | - | δ : 7.21 ϵ, ζ : 7.46 |
| Gln ³ | 8.89 | 5.02 | 2.01, 1.86 | 2.36, 2.07 | ϵ : n.b. |
| Cys ⁴ | 9.17 | 4.50 | 3.26, 2.96 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.45 | 4.65 | 4.65 | 1.27 | - |
| Phe ⁶ | 8.87 | 4.31 | 2.57, 2.46 | - | δ : 6.97 ϵ, ζ : 7.32 |
| Hot ⁷ | 8.97 | 3.57 | 4.10 | 4.09 | δ : 5.06 |
| Tap ⁸ | - | 5.56 | 3.43, 3.02 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.19 | 4.16 | 3.31 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.64 | 3.98, 3.89 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 7.99 | 3.96 | 1.44 | 1.23 | δ : 1.54 ϵ : 3.06 |
| Arg ¹² | 7.80 | 4.96 | 1.60 | 1.49, 1.41 | δ : 3.08 ϵ : n.b. |
| X ¹³ | 8.61 | 4.87 | 3.46, 2.64 | - | δ^1 : 7.30 δ^2 : 6.83 $\epsilon^1\text{-CH}$: 2.83 $\epsilon^1\text{-iPr}$: 1.21 ϵ^2 : 6.52 ζ : 6.15 |
| Ser ¹⁴ | n.b. | 4.61 | 4.08 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 7.56 | 4.14 | 1.67, 1.59 | 1.03 | δ : 1.03 |
| Asp ¹⁶ | 8.55 | 3.46 | 2.04 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.54 | 4.14 | 3.29, 2.74 | - | δ : 7.16 ϵ, ζ : 7.33 |
| Asn ¹⁸ | 6.84 | 4.41 | 2.81, 2.67 | - | δ : n.b. |
| Leu ¹⁹ | 6.99 | 3.49 | 2.14 | 1.70 | δ : 1.34, 1.12 |
| Lys ²⁰ | 8.17 | 3.87 | 1.74 | 1.48, 1.36 | δ : 1.58 ϵ : 2.96 |
| Thr ²¹ | 7.48 | 3.79 | 4.04 | 1.11 | - |
| His ²² | 7.61 | 4.18 | 3.21, 2.85 | - | δ^2 : 7.20 ϵ^1 : 8.03 |
| Val ²³ | 8.45 | 3.51 | 2.32 | 1.30 | - |

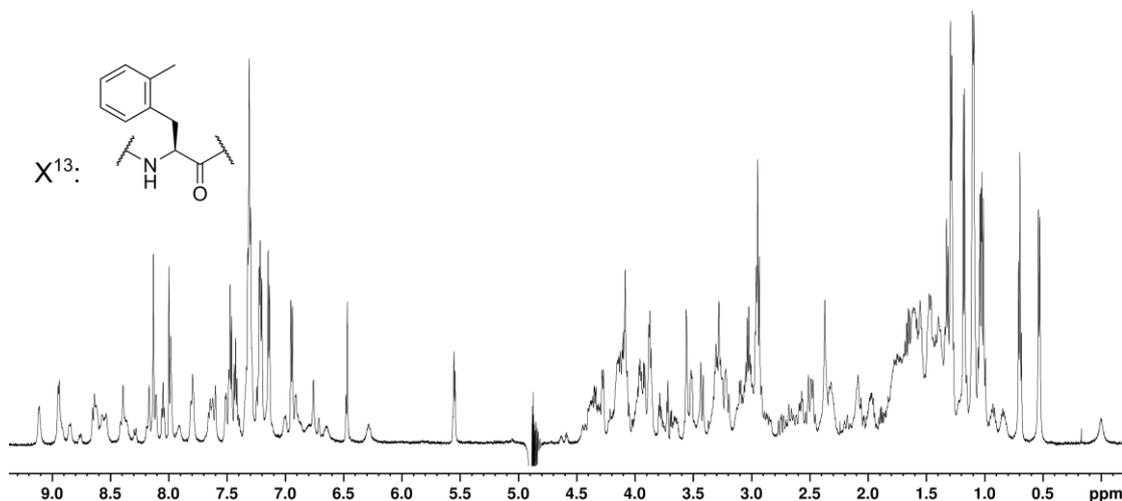
Experimenteller Teil

| | | | | | |
|-------------------|------|------------|------------|------------|--|
| Lys ²⁴ | 6.92 | 4.10 | 1.75 | 1.56, 1.43 | δ: 1.68 ε: 2.95 |
| Ile ²⁵ | 7.81 | 3.91 | 1.69 | 0.96, 0.83 | γ ^{CH₃} : 0.54 δ: 0.71 |
| His ²⁶ | 7.24 | 4.39 | 2.52, 1.56 | - | δ ² : 6.48 ε ¹ : 8.14 |
| Thr ²⁷ | 7.65 | 4.28 | 4.35 | 1.18 | - |
| Gly ²⁸ | 8.05 | 3.94, 3.72 | - | - | - |

HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₉H₂₂₉N₄₀O₃₉S₃] [M+3H]³⁺: 1100.2120, gef.: 1100.2364

rp-HPLC: tr = 8.24 min (10% - 50% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



ZFV-10 (PXDI-105)


$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 300K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, 1.5 eq Zn^{2+} , pH = 6.0, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

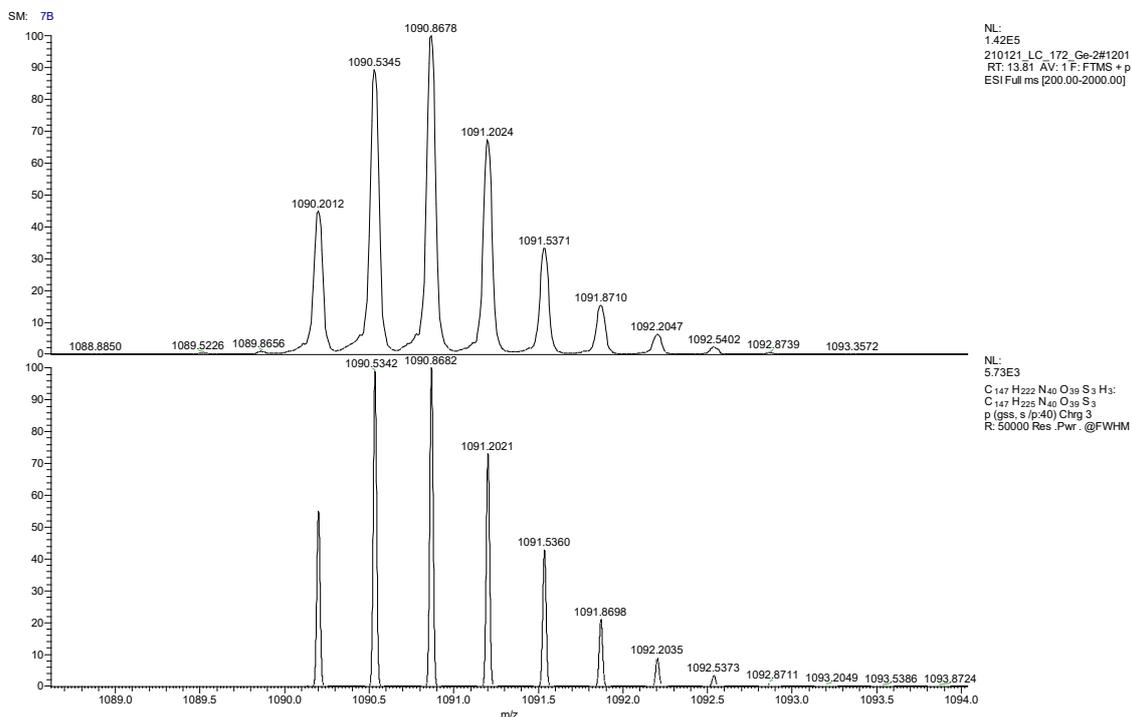
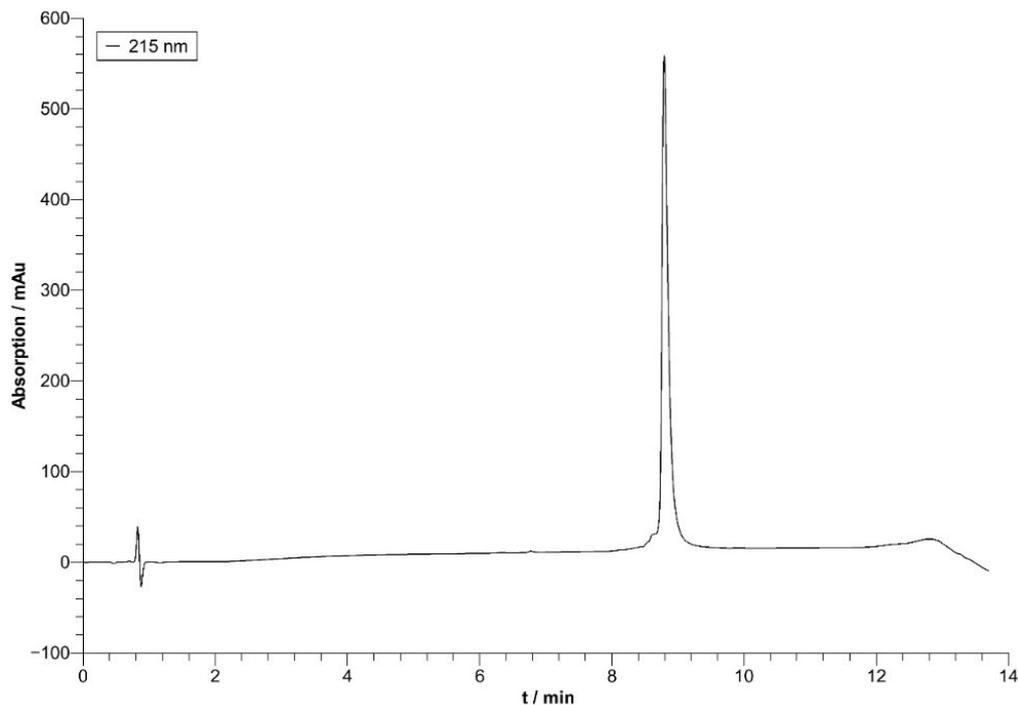
| Aminosäure | $\delta(\text{NH})$ / ppm | $\delta(\alpha)$ / ppm | $\delta(\beta)$ / ppm | $\delta(\gamma)$ / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|---|
| Pro ¹ | n.b. | 4.24 | 2.24, 1.98 | 1.90, 1.80 | δ : 3.30 |
| Phe ² | n.b. | n.b. | n.b. | - | δ : 7.21 ϵ, ζ : 7.46 |
| Gln ³ | 8.77 | 5.06 | 1.97, 1.84 | 2.35, 2.06 | ϵ : n.b. |
| Cys ⁴ | 9.05 | 4.43 | 3.20, 2.94 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.27 | 4.62 | 4.62 | 1.29 | - |
| Phe ⁶ | 8.92 | 4.31 | 2.55, 2.48 | - | δ : 6.97 ϵ, ζ : 7.32 |
| Hot ⁷ | 8.87 | 3.58 | 4.08 | 4.09 | δ : 5.05 |
| Tap ⁸ | - | 5.54 | 3.43, 3.02 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.11 | 4.15 | 3.28 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.56 | 3.96, 3.88 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 7.94 | 3.93 | 1.41 | 1.21 | δ : 1.55 ϵ : 3.03 |
| Arg ¹² | 7.74 | 5.03 | 1.62, 1.50 | 1.42 | δ : 3.09 ϵ : n.b. |
| X ¹³ | 8.62 | 4.99 | 3.49, 2.63 | - | δ^1 -Me: 2.35 δ^2 : 7.01 ϵ^1 : 6.79 ϵ^2 : 6.67 ζ : 6.31 |
| Ser ¹⁴ | n.b. | 4.60 | 4.08 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 7.62 | 4.88 | 1.62 | 1.47 | δ : 1.03 |
| Asp ¹⁶ | 8.25 | 3.10 | n.b. | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.45 | 4.16 | 3.29, 2.77 | - | δ : 7.15 ϵ, ζ : 7.31 |
| Asn ¹⁸ | 6.89 | 4.38 | 2.66, 2.49 | - | δ : 7.53, 6.73 |
| Leu ¹⁹ | 7.15 | 3.66 | 2.15, 1.69 | 1.34 | δ : 1.09 |
| Lys ²⁰ | 8.05 | 3.88 | 1.76 | 1.44 | δ : 1.66 ϵ : 2.96 |
| Thr ²¹ | 7.49 | 3.81 | 3.99 | 1.10 | - |
| His ²² | 7.49 | 4.19 | 3.22, 2.88 | - | δ^2 : 7.24 ϵ^1 : 7.99 |
| Val ²³ | 8.34 | 3.53 | 2.32 | 1.32, 1.27 | - |
| Lys ²⁴ | 6.90 | 4.11 | 1.76 | 1.49 | δ : 1.67 |

Experimenteller Teil

| | | | | | |
|-------------------|------|------------|------------|------------|--|
| Ile ²⁵ | 7.76 | 3.88 | 1.64 | 0.94, 0.84 | ϵ : 2.96 γ^{CH_3} : 0.54 |
| His ²⁶ | 7.20 | 4.40 | 2.50, 1.63 | - | δ : 0.70 δ^2 : 6.47 |
| Thr ²⁷ | 7.63 | 4.28 | 4.34 | 1.17 | ϵ^1 : 8.13 |
| Gly ²⁸ | 8.00 | 3.93, 3.71 | - | - | - |

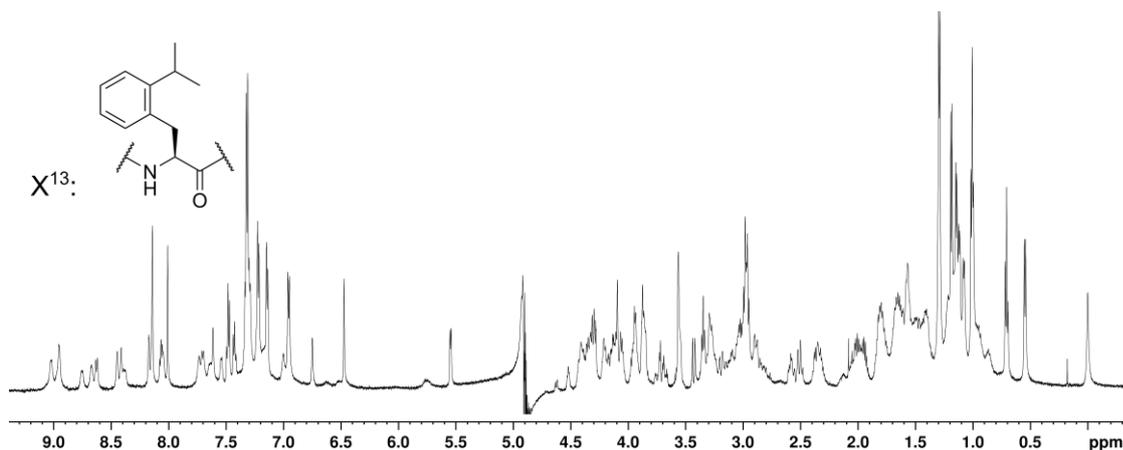
HPLC-MS (ESI+): ber. für $[\text{C}_{147}\text{H}_{225}\text{N}_{40}\text{O}_{39}\text{S}_3]$ $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$: 1090.8682, gef.: 1090.8678

rp-HPLC: tr = 8.79 min (10% - 40% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



ZFV-11 (PXDI-221)

Der Austausch von F¹³ durch δ -isopropyl-Phenylalanin führt nach Zugabe von 1.5 eq Zink zu einer definierten einheitlichen Struktur mit charakteristischen Zinkfinger-Signalen. Ein Blick auf das ¹H-NMR-Spektrum zeigt jedoch, dass nicht sämtliche Signale vorhanden sind. Durch die Verwendung von 2D-Spektroskopie konnten 70% der Struktur aufgeklärt werden. L¹⁵-N¹⁸ sind nicht bestimmbar.



¹H-NMR: 600 MHz, 290K, H₂O/D₂O 9:1, 1.5 eq Zn²⁺, pH = 6.3, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

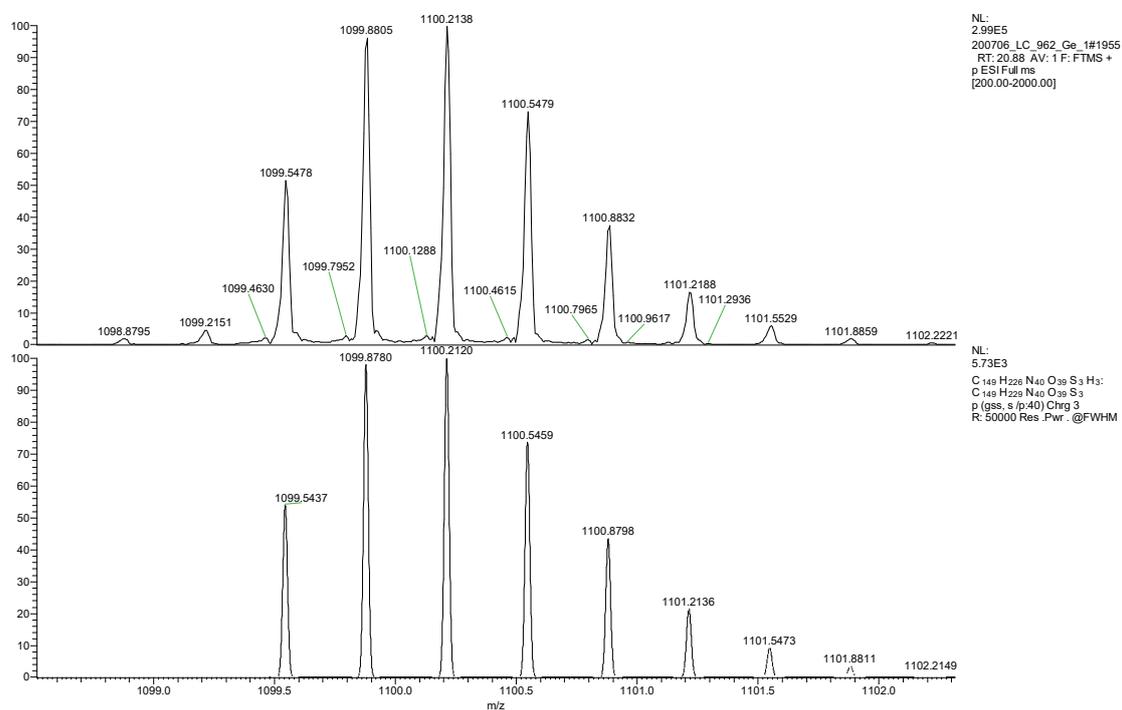
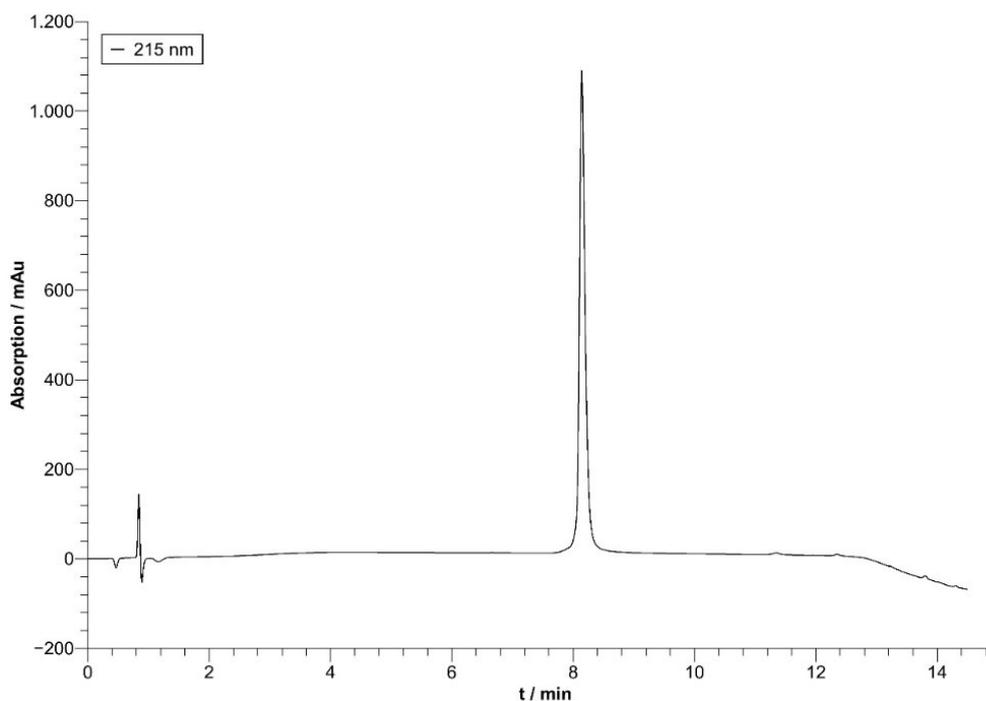
| Aminosäure | $\delta(\text{NH})$ / ppm | $\delta(\alpha)$ / ppm | $\delta(\beta)$ / ppm | $\delta(\gamma)$ / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|--|
| Pro ¹ | n.b. | 4.32 | 2.37, 2.01 | 1.95, 1.81 | δ : 3.35 |
| Phe ² | 8.97 | 4.74 | 3.20, 2.88 | - | δ : 7.22 ϵ, ζ : 8.75 |
| Gln ³ | 8.75 | 4.99 | 1.91 | 2.36, 2.05 | ϵ : n.b. |
| Cys ⁴ | 9.02 | 4.43 | 3.16, 2.91 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.38 | 4.63 | 4.63 | 1.29 | - |
| Phe ⁶ | 9.02 | 4.33 | 2.60, 2.51 | - | δ : 6.96 ϵ, ζ : 7.33 |
| Hot ⁷ | 8.95 | 3.57 | 4.10 | 4.09 | δ : 5.07 |
| Tap ⁸ | - | 5.55 | 3.43, 3.02 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.17 | 4.16 | 3.29 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.67 | 3.96, 3.87 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 8.04 | 3.93 | 1.58 | 1.45, 1.34 | δ : 1.67 ϵ : 2.95 |
| Arg ¹² | 7.64 | 5.09 | 1.57 | 1.47, 1.40 | δ : 3.07 ϵ : n.b. |
| X ¹³ | 8.63 | 5.01 | 3.71, 2.68 | - | δ^1 -iPr: n.b. δ^2 : n.b. $\epsilon^1, \epsilon^2, \zeta$: n.b. |
| Ser ¹⁴ | n.b. | 4.52 | 4.09 | - | - |
| Leu ¹⁵ | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | δ : n.b. |
| Asp ¹⁶ | n.b. | n.b. | n.b. | - | - |
| Phe ¹⁷ | n.b. | n.b. | n.b. | - | δ, ϵ, ζ : n.b. |
| Asn ¹⁸ | n.b. | n.b. | n.b. | - | δ : n.b. |
| Leu ¹⁹ | 7.17 | 3.09 | 1.57 | 1.48 | δ : 1.40 |
| Lys ²⁰ | 8.14 | 3.95 | 1.81 | 1.41 | δ : 1.63 ϵ : 2.99 |
| Thr ²¹ | 7.54 | 3.87 | 4.06 | 1.15 | - |
| His ²² | n.b. | n.b. | 3.17, 2.90 | - | δ^2 : 7.29 ϵ^1 : 8.01 |
| Val ²³ | 8.41 | 3.55 | 2.33 | 1.30 | - |

Experimenteller Teil

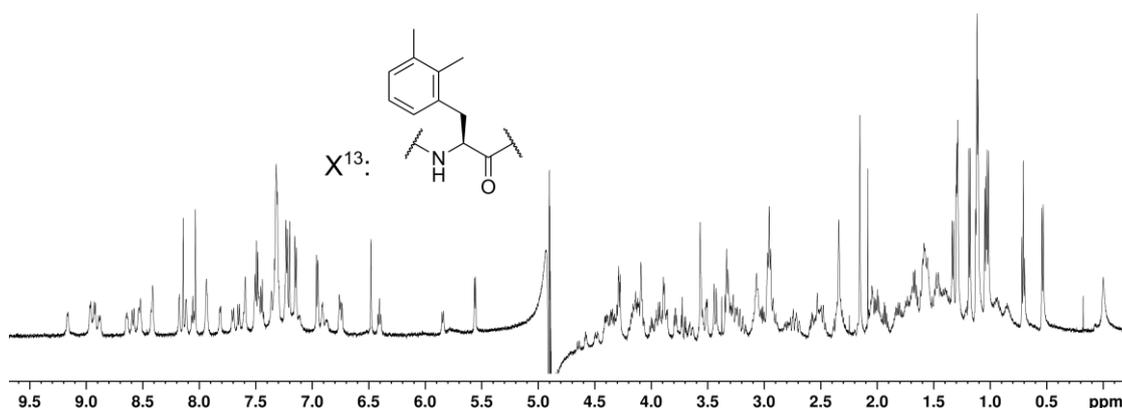
| | | | | | |
|-------------------|------|------------|------------|------------|------------------------------------|
| Lys ²⁴ | 7.00 | 4.13 | 1.78 | 1.56 | δ: 1.68 |
| Ile ²⁵ | 7.74 | 3.88 | 1.64 | 0.96, 0.87 | ε: 2.97 |
| His ²⁶ | 7.23 | 4.42 | 2.53, 1.59 | - | γ ^{CH₃} : 0.55 |
| Thr ²⁷ | 7.70 | 4.30 | 4.36 | 1.19 | δ: 0.71 |
| Gly ²⁸ | 8.07 | 3.95, 3.72 | - | - | δ ² : 6.48 |
| | | | | | ε ¹ : 8.15 |

HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₉H₂₂₉N₄₀O₃₉S₃] [M+3H]³⁺: 1100.2120, gef.: 100.2138

rp-HPLC: tr = 8.14 min (10% - 50% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



ZFV-12 (PXDI-235)



$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 290K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, 1.5 eq Zn^{2+} , pH = 6.9, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

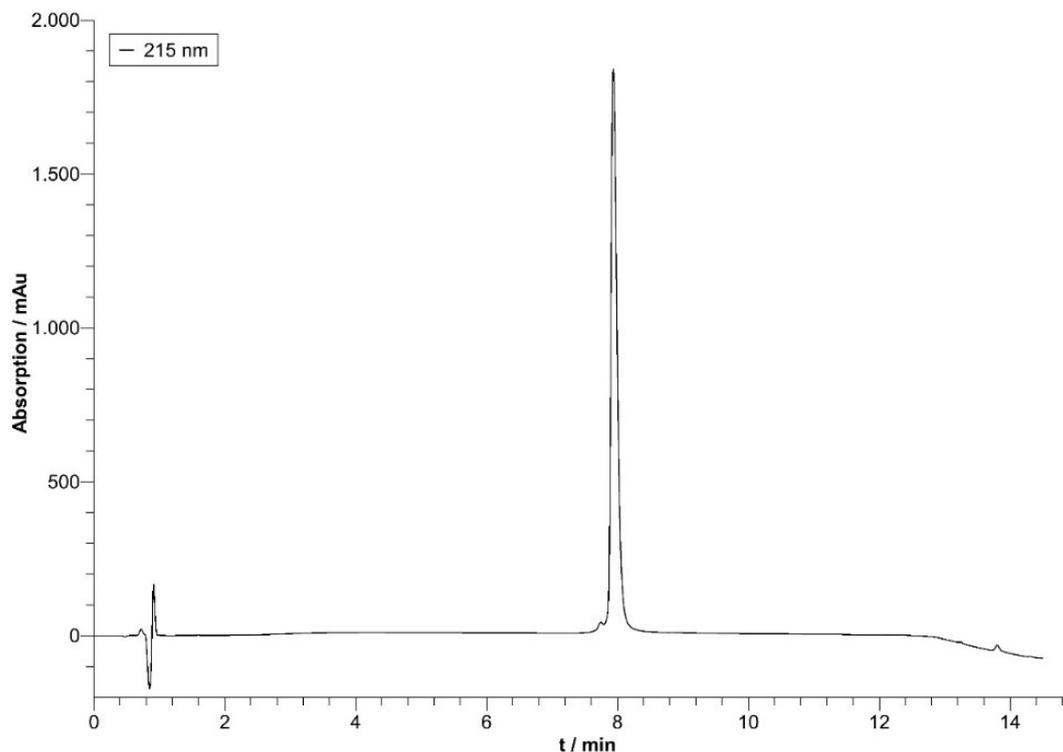
| Aminosäure | $\delta(\text{NH})$ / ppm | $\delta(\alpha)$ / ppm | $\delta(\beta)$ / ppm | $\delta(\gamma)$ / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|--|
| Pro ¹ | n.b. | 4.28 | 2.36, 1.99 | 1.93, 1.81 | δ : 3.33 |
| Phe ² | 8.95 | 4.78 | 3.25, 2.92 | - | δ : 7.22 ϵ, ζ : 7.48 |
| Gln ³ | 8.87 | 5.07 | 1.98, 1.84 | 2.35, 2.07 | ϵ : n.b. |
| Cys ⁴ | 9.16 | 4.48 | 3.23, 2.96 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.41 | 4.64 | 4.72 | 1.29 | - |
| Phe ⁶ | 8.92 | 4.31 | 2.58, 2.47 | - | δ : 6.95 ϵ, ζ : 7.31 |
| Hot ⁷ | 8.96 | 3.56 | 4.09 | 4.08 | δ : 5.05 |
| Tap ⁸ | - | 5.55 | 3.43, 3.01 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.17 | 4.15 | 3.30 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.63 | 3.96, 3.88 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 7.93 | 3.92 | 1.56 | 1.20 | δ : 1.38 ϵ : 3.06 |
| Arg ¹² | 7.69 | 4.99 | 1.59 | 1.43 | δ : 3.07 ϵ : n.b. |
| X ¹³ | 8.58 | 4.99 | 3.64, 2.53 | - | δ^1 -Me: 2.33 ϵ^1 -Me: 2.15 δ^2 : 6.74 ϵ^2 : 6.40 ζ : 5.84 |
| Ser ¹⁴ | n.b. | 4.58 | 4.11 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 7.59 | n.b. | 1.69, 1.61 | 1.46 | δ : 1.03 |
| Asp ¹⁶ | 8.52 | 3.42 | 2.04 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.53 | 4.15 | 3.30, 2.74 | - | δ : 7.14 ϵ, ζ : 7.31 |
| Asn ¹⁸ | 6.87 | 4.40 | 2.71, 2.51 | - | δ : 7.58, 6.75 |
| Leu ¹⁹ | 7.11 | 3.55 | 2.17 | 1.68 | δ : 1.34, 1.11 |
| Lys ²⁰ | 8.11 | 3.87 | 1.74 | 1.48, 1.37 | δ : 1.58 ϵ : 2.96 |
| Thr ²¹ | 7.50 | 3.78 | 3.99 | 1.11 | - |
| His ²² | 7.47 | 4.18 | 3.18, 2.80 | - | δ^2 : 7.20 ϵ^1 : 8.03 |
| Val ²³ | 8.41 | 3.51 | 2.31 | 1.31 | - |
| Lys ²⁴ | 6.91 | 4.10 | 1.75 | 1.51 | δ : 1.68 ϵ : 2.95 |
| Ile ²⁵ | 7.81 | 3.89 | 1.66 | 0.93, 0.85 | γ^{CH_3} : 0.53 δ : 0.71 |

Experimenteller Teil

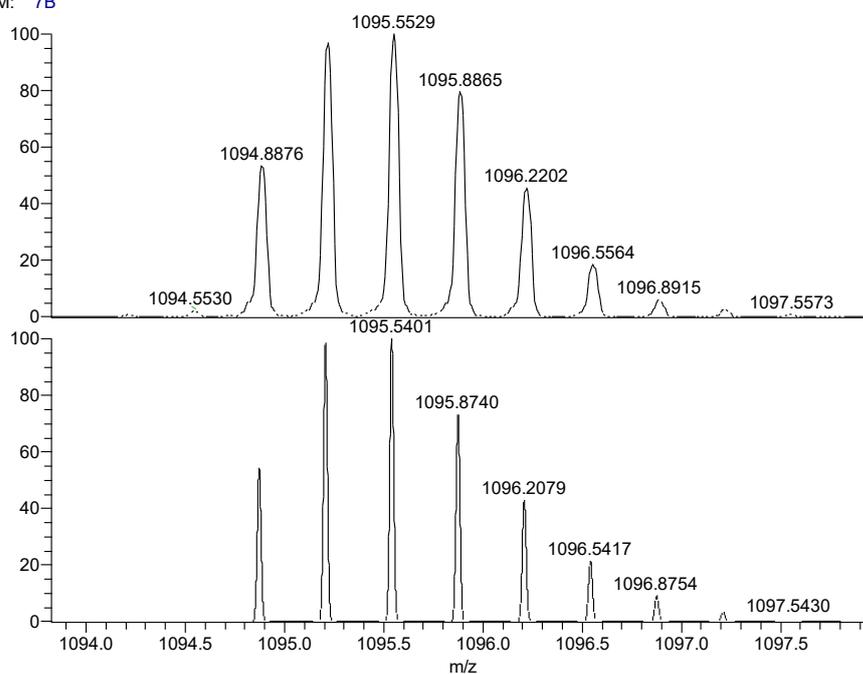
| | | | | | |
|-------------------|------|------------|------------|------|--|
| His ²⁶ | 7.23 | 4.38 | 2.51, 1.56 | - | δ ² : 6.48 ε ¹ : 8.14 |
| Thr ²⁷ | 7.65 | 4.28 | 4.34 | 1.18 | - |
| Gly ²⁸ | 8.05 | 3.93, 3.71 | - | - | - |

HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₈H₂₂₇N₄₀O₃₉S₃] [M+3H]³⁺: 1095.5401, gef.: 1095.5529

rp-HPLC: tr = 7.94 min (10% - 50% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



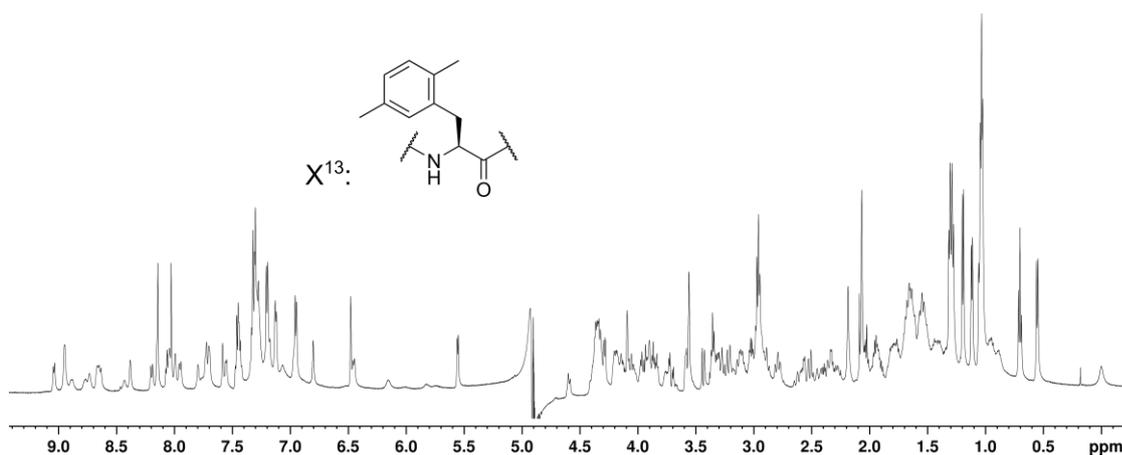
SM: 7B



NL:
2.46E6
201113_LC_085_Ge#1227
RT: 13.88 AV: 1 T: FTMS + p
ESI Full ms [200.00-2000.00]

NL:
5.73E3
C₁₄₈H₂₂₄N₄₀O₃₉S₃H₃:
C₁₄₈H₂₂₇N₄₀O₃₉S₃
p (gss, s/p:40) Chrg 3
R: 50000 Res .Pwr .@FWHM

ZFV-13 (PXDI-236)



¹H-NMR: 600 MHz, 290K, H₂O/D₂O 9:1, 1.5 eq Zn²⁺, pH = 6.8, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

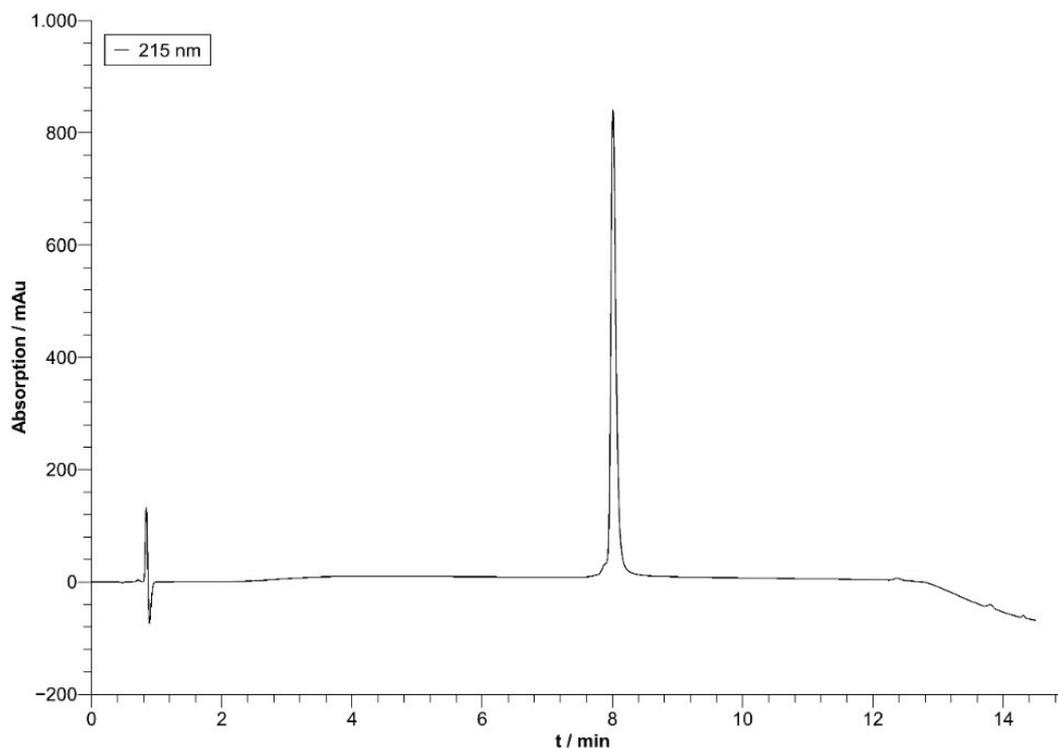
| Aminosäure | δ(NH) / ppm | δ(α) / ppm | δ(β) / ppm | δ(γ) / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|-------------|------------|------------|------------|---|
| Pro ¹ | n.b. | 4.32 | 2.40, 2.02 | 1.93 | δ: 3.35 |
| Phe ² | 8.89 | 4.81 | 3.23, 2.90 | - | δ: 7.21 ε, ζ: 7.45 |
| Gln ³ | 8.77 | 5.08 | 1.95, 1.83 | 2.36, 2.06 | ε: n.b. |
| Cys ⁴ | 8.95 | 4.36 | 3.14, 2.94 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.20 | 4.60 | 4.72 | 1.31 | - |
| Phe ⁶ | 9.04 | 4.34 | 2.57, 2.52 | - | δ: 6.96 ε, ζ: 7.32 |
| Hot ⁷ | 8.95 | 3.56 | 4.10 | 4.09 | δ: 5.07 |
| Tap ⁸ | - | 5.56 | 3.44, 3.03 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.16 | 4.16 | 3.28 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.67 | 3.91 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 8.00 | 3.97 | 1.53 | 1.30 | δ: 1.37 ε: 2.97 |
| Arg ¹² | 7.95 | 5.09 | 1.68, 1.66 | 1.54, 1.45 | δ: 3.10 ε: 7.22 |
| X ¹³ | 8.64 | n.b. | 3.19, 2.79 | - | δ ¹ -Me: 2.07 δ ² : 7.07 ε ¹ : 6.16 ε ² -Me: 2.19 ζ: 6.46 |
| Ser ¹⁴ | n.b. | 4.61 | 4.07 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 7.77 | n.b. | 1.66, 1.56 | 1.34 | δ: 1.03 |
| Asp ¹⁶ | n.b. | n.b. | n.b. | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.43 | 4.21 | 3.29, 2.80 | - | δ: 7.13 ε, ζ: 7.28 |
| Asn ¹⁸ | 7.05 | 4.38 | 2.62 | - | δ: n.b. |
| Leu ¹⁹ | 7.32 | 3.76 | 2.09, 1.35 | 1.68 | δ: 1.04 |
| Lys ²⁰ | 8.05 | 3.90 | 1.78 | 1.50, 1.39 | δ: 1.62 ε: 2.97 |
| Thr ²¹ | 7.56 | 3.84 | 4.03 | 1.12 | - |
| His ²² | 7.70 | 4.20 | 3.23, 2.92 | - | δ ² : 7.30 ε ¹ : 8.03 |
| Val ²³ | 8.38 | 3.59 | 2.32 | 1.29 | - |
| Lys ²⁴ | 6.97 | 4.13 | 1.78, 1.69 | 1.44 | δ: 1.54 ε: 2.96 |

Experimenteller Teil

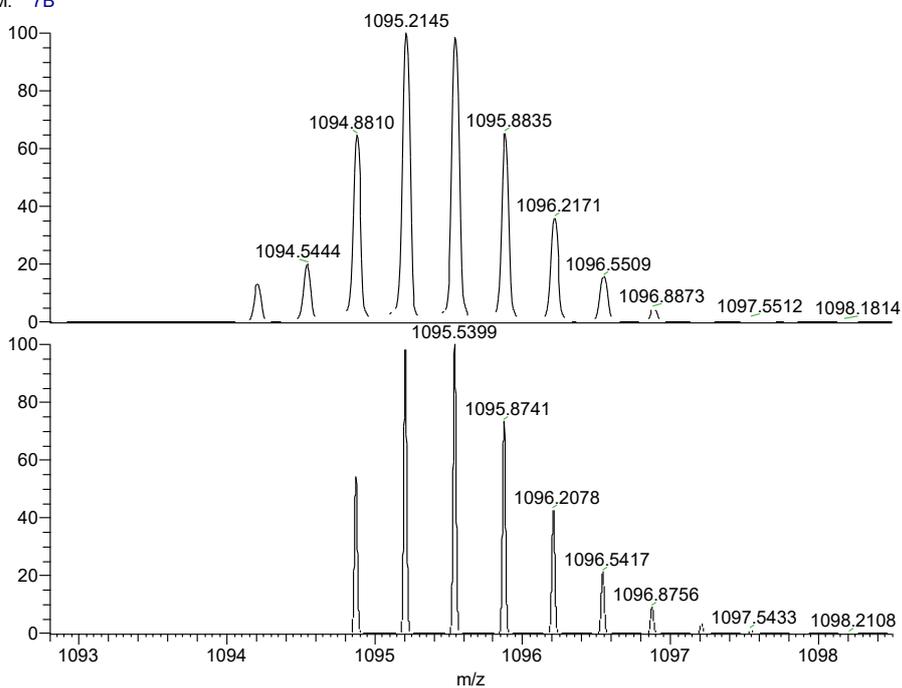
| | | | | | |
|-------------------|------|------------|------------|------------|-------------------------------|
| Ile ²⁵ | 7.74 | 3.87 | 1.64 | 0.95, 0.89 | γ^{CH_3} : 0.55 |
| His ²⁶ | 7.19 | 4.40 | 2.53, 1.59 | - | δ : 0.71 |
| Thr ²⁷ | 7.72 | 4.29 | 4.36 | 1.20 | δ^2 : 6.48 |
| Gly ²⁸ | 8.07 | 3.95, 3.72 | - | - | ϵ^1 : 8.15 |

HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₈H₂₂₇N₄₀O₃₉S₃] [M+3H]³⁺: 1095.8741, gef.: 1095.8835

rp-HPLC: tr = 8.01 min (10% - 50% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



SM: 7B

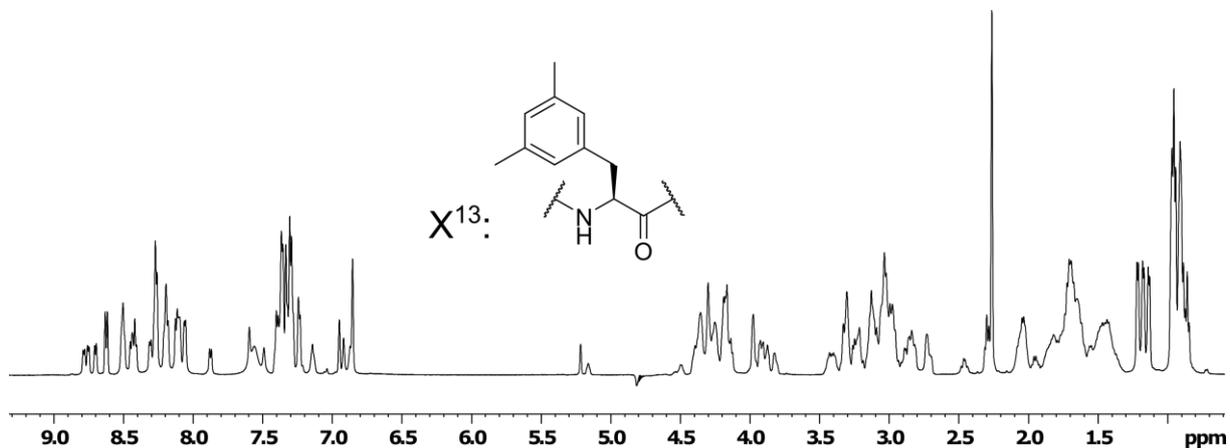


NL:
1.37E6
201113_LC_086_Ge#1187
RT: 13.56 AV: 1 T: FTMS + p
ESI Full ms [200.00-2000.00]

NL:
5.73E3
C₁₄₈H₂₂₄N₄₀O₃₉S₃H₃:
C₁₄₈H₂₂₇N₄₀O₃₉S₃
p (gss, s/p:40) Chrg 3
R: 50000 Res .Pwr . @FWHM

ZFV-14 (PXDI-061)

Das Ersetzen von Phenylalanin an Position 13 durch ϵ,ϵ' -Dimethyl-Phenyl führt nach Zugabe von Zink zu keiner definierten Struktur. Eine Erhöhung des pH-Wertes resultierte in Aggregation. Zwar sind charakteristische Signale einer gefalteten Struktur erkennbar, jedoch reichte die Qualität der erhaltenden 2D-Spektren nicht für die Charakterisierung. Aus diesem Grund wurde die Struktur in Abwesenheit von Zink charakterisiert (*apo*).



$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 300K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH = 3.1, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

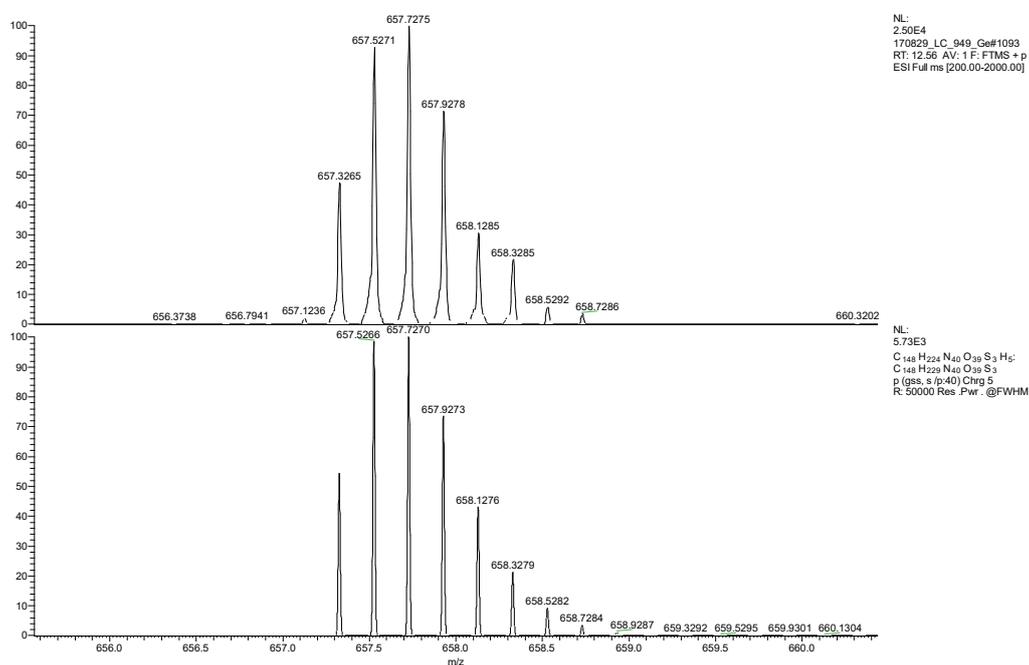
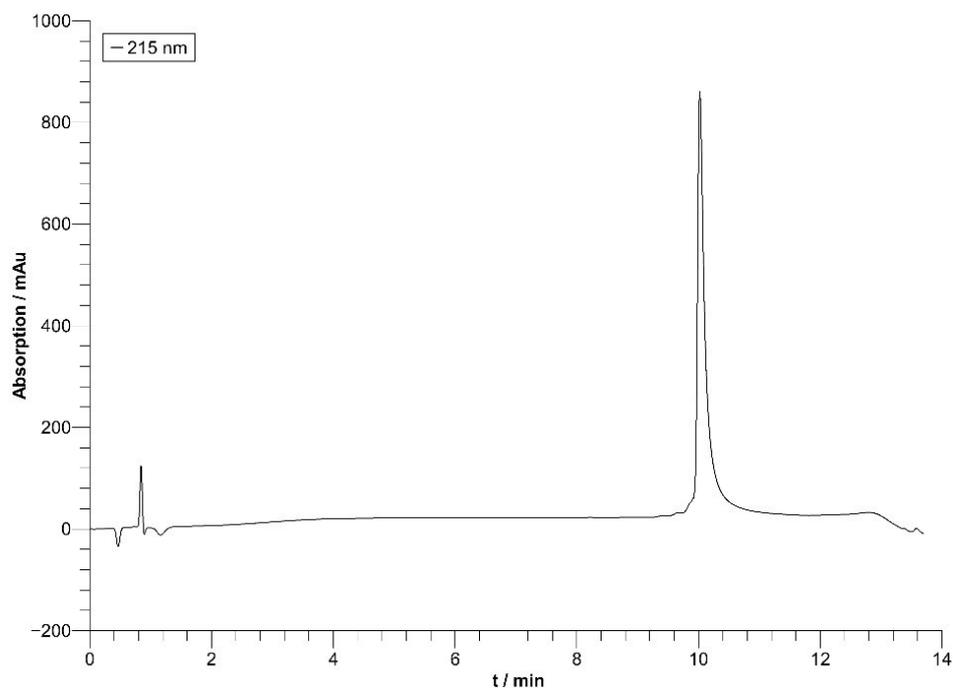
| Aminosäure | $\delta(\text{NH})$ / ppm | $\delta(\alpha)$ / ppm | $\delta(\beta)$ / ppm | $\delta(\gamma)$ / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|--|
| Pro ¹ | n.b. | 4.36 | 2.38 | 2.04 | δ : 3.42 |
| Phe ² | 8.75 | 4.69 | 3.12 | - | δ : 7.24 ϵ, ζ : 7.36 |
| Gln ³ | 8.43 | 4.36 | 2.03, 1.95 | 2.30 | ϵ : 7.49, 6.88 |
| Cys ⁴ | 8.45 | 4.50 | 2.88 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.19 | 4.36 | 4.20 | 1.14 | - |
| Phe ⁶ | 8.19 | 4.35 | 3.23, 3.02 | - | δ : 7.28 ϵ, ζ : 7.40 |
| Hot ⁷ | 8.79 | 4.17 | 4.31 | 4.30 | δ : 5.22 |
| Tap ⁸ | - | 5.16 | 3.33 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.42 | 4.50 | 3.02, 2.99 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.51 | 3.98 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 8.10 | 4.27 | 1.73 | 1.39 | δ : 1.70 ϵ : 3.06 |
| Arg ¹² | 8.27 | 4.25 | 1.70 | 1.49 | δ : 3.13 ϵ : 7.15 |
| X ¹³ | 8.12 | 4.61 | 3.08, 2.96 | - | δ : 6.86 $\epsilon\text{-Me}$: 2.27 ζ : 6.96 |
| Ser ¹⁴ | 8.06 | 4.39 | 3.85 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 8.20 | 4.32 | 1.59 | 1.49 | δ : 0.90 |
| Asp ¹⁶ | 8.27 | 4.64 | 2.83, 2.73 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.10 | 4.54 | 3.13 | - | δ : n.b. ϵ, ζ : n.b. |
| Asn ¹⁸ | 8.31 | 4.66 | 2.85, 2.72 | - | δ : 7.60, 6.92 |
| Leu ¹⁹ | 8.06 | 4.29 | 1.67 | 1.39 | δ : 0.94 |
| Lys ²⁰ | 8.27 | 4.41 | 1.83 | 1.49 | δ : 1.69 ϵ : 3.126 |
| Thr ²¹ | 7.88 | 4.30 | 4.19 | 1.18 | - |
| His ²² | 8.51 | 4.76 | 3.32, 3.21 | - | δ^2 : 7.31 ϵ^1 : 8.63 |

Experimenteller Teil

| | | | | | |
|-------------------|------|------|------|------|------------------------------------|
| Val ²³ | 8.12 | 4.14 | 2.07 | 0.95 | - |
| Lys ²⁴ | 8.50 | 4.38 | 1.82 | 1.45 | δ: 1.75 |
| Ile ²⁵ | 8.20 | 4.19 | 1.84 | 1.61 | ε: 3.04 |
| His ²⁶ | 8.70 | 4.82 | 3.28 | - | γ ^{CH₃} : 0.89 |
| Thr ²⁷ | 8.27 | 4.41 | 4.26 | 1.22 | δ: 0.89 |
| Gly ²⁸ | 8.27 | 3.92 | - | - | δ ² : 7.34 |
| | | | | | ε ¹ : 8.63 |

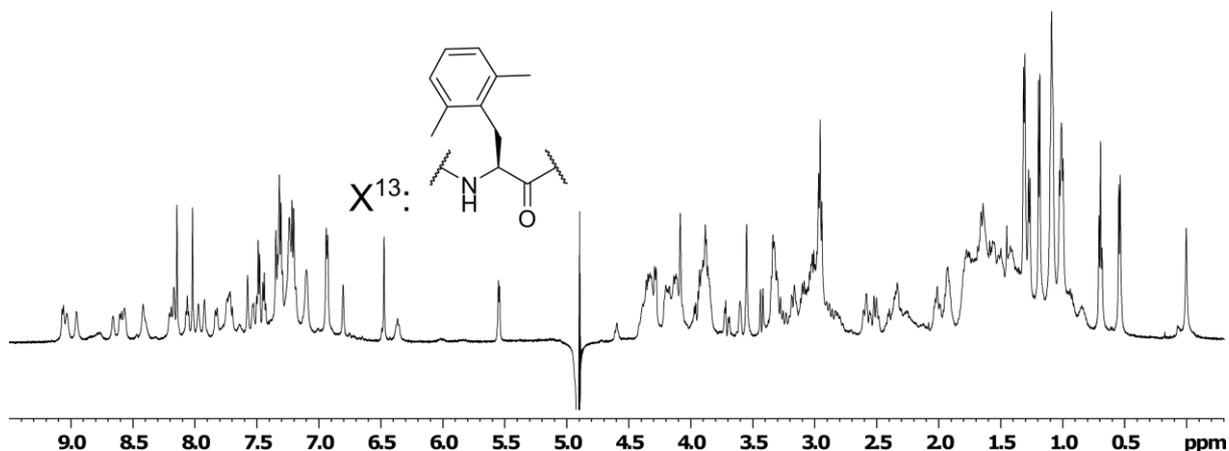
HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₈H₂₂₉N₄₀O₃₉S₃] [M+5H]⁵⁺: 657.7270, gef.: 657.7275

rp-HPLC: tr = 10.02 min (10% - 40% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



ZFV-14 (PXDI-073)

Das Ersetzen von Phenylalanin an Position 13 durch δ,δ' -Dimethyl-Phenyl führt nach Zugabe von Zink zu einem Signalsatz. Nach der Aufnahme und Auswertung von 2D-Spektren wurde ersichtlich, dass die Signale im Bereich von L¹⁵-L¹⁹ fehlen. Aufgrund der charakteristischen Signale kann von einer Zinkfingerstruktur trotzdem ausgegangen werden. Die Charakterisierung der apo-Variante bestätigte die Vollständigkeit der Sequenz.



¹H-NMR: 600 MHz, 290K, H₂O/D₂O 9:1, 1.5 eq Zn²⁺, pH = 7.0, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

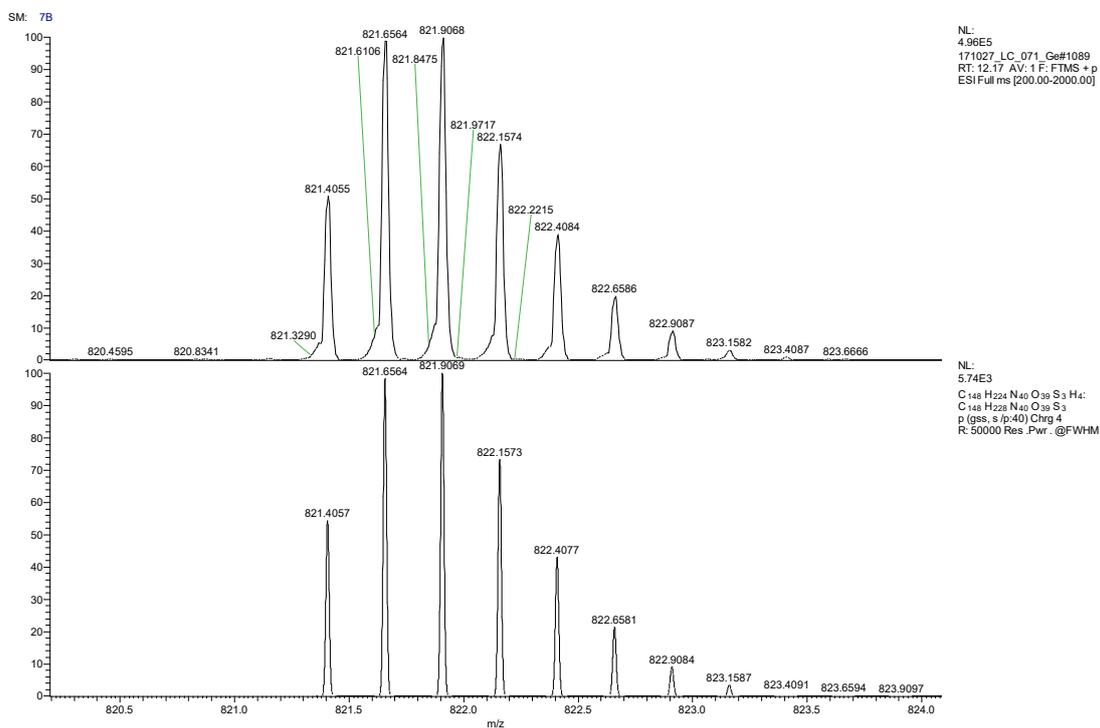
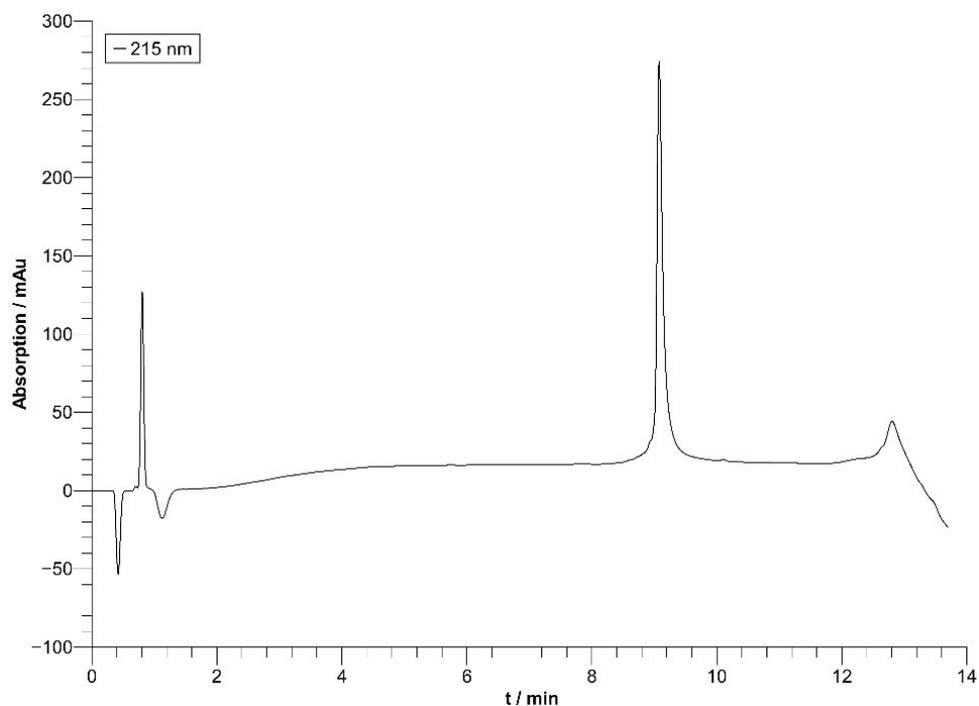
| Aminosäure | $\delta(\text{NH})$ / ppm | $\delta(\alpha)$ / ppm | $\delta(\beta)$ / ppm | $\delta(\gamma)$ / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|---|
| Pro ¹ | n.b. | 4.32 | 2.39, 2.02 | 1.93 | δ : 3.35 |
| Phe ² | n.b. | n.b. | n.b. | - | δ, ϵ, ζ : n.b. |
| Gln ³ | 8.63 | 5.12 | 1.93 | 2.31, 2.03 | ϵ : 6.74, 7.47 |
| Cys ⁴ | 8.94 | 4.38 | 3.16, 2.95 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.10 | 4.6 | 4.6 | 1.31 | - |
| Phe ⁶ | 9.01 | 4.32 | 2.54 | - | δ : 6.97 ϵ, ζ : 7.32 |
| Hot ⁷ | 8.85 | 3.58 | 4.10 | 4.09 | δ : 5.05 |
| Tap ⁸ | - | 5.54 | 3.44, 3.03 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.10 | 4.16 | 3.28 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.49 | 3.94, 3.90 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 7.88 | 3.91 | 1.63 | 1.50 | δ : 1.41 ϵ : 2.98 |
| Arg ¹² | 7.72 | 5.06 | 1.66, 1.64 | 1.52 | δ : 3.10 ϵ : n.b. |
| X ¹³ | 8.57 | 5.10 | 3.31, 2.84 | - | δ -Me: n.b. ϵ : n.b. ζ : 6.38 |
| Ser ¹⁴ | n.b. | 4.59 | 4.11, 4.08 | - | - |
| Leu ¹⁵ | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | δ : n.b. |
| Asp ¹⁶ | n.b. | n.b. | n.b. | - | - |
| Phe ¹⁷ | n.b. | n.b. | n.b. | - | δ, ϵ, ζ : n.b. |
| Asn ¹⁸ | n.b. | n.b. | n.b. | - | δ : n.b. |
| Leu ¹⁹ | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | δ : n.b. |
| Lys ²⁰ | 8.18 | 3.84 | n.b. | n.b. | δ : n.b. ϵ : n.b. |
| Thr ²¹ | 7.49 | 3.88 | 3.99 | 1.10 | - |
| His ²² | 7.72 | 4.22 | 3.23, 2.95 | - | δ^2 : 7.35 ϵ^1 : 7.99 |
| Val ²³ | 8.33 | 3.60 | 2.34 | 1.28 | - |

Experimenteller Teil

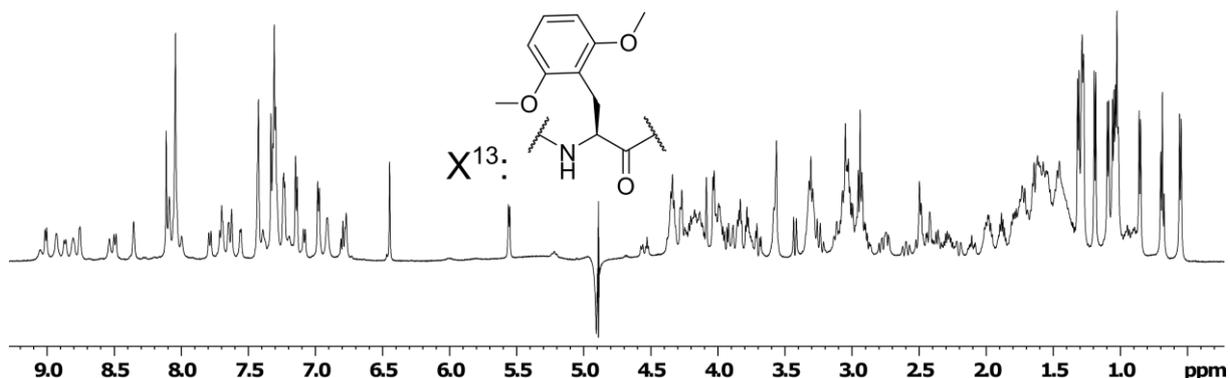
| | | | | | |
|-------------------|------|------------|------------|------------|---|
| Lys ²⁴ | 6.92 | 4.13 | 1.78 | 1.43 | δ : 1.67 |
| Ile ²⁵ | 7.68 | 3.89 | 1.64 | 0.86, 0.95 | ϵ : 2.97 γ^{CH_3} : 0.55 |
| His ²⁶ | 7.19 | 4.42 | 2.51, 1.67 | - | δ : 0.70 δ^2 : 6.46 ϵ^1 : 8.14 |
| Thr ²⁷ | 7.66 | 4.29 | 3.35 | 1.19 | - |
| Gly ²⁸ | 7.98 | 3.94, 3.72 | - | - | - |

HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₈H₂₂₈N₄₀O₃₉S₃] [M+4H]⁴⁺: 821.9069, gef.: 821.9068

rp-HPLC: tr = 9.09 min (15% - 40% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



ZFV-16 (PXDI-076)



$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 290K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, 1.5 eq Zn^{2+} , pH = 7.2, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

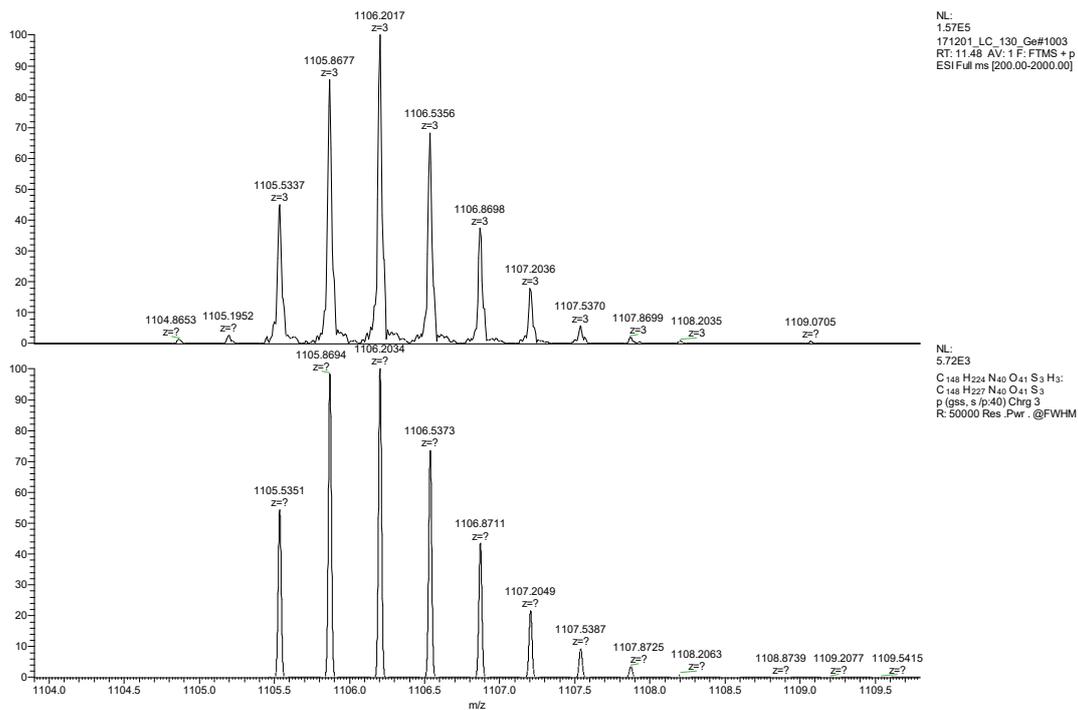
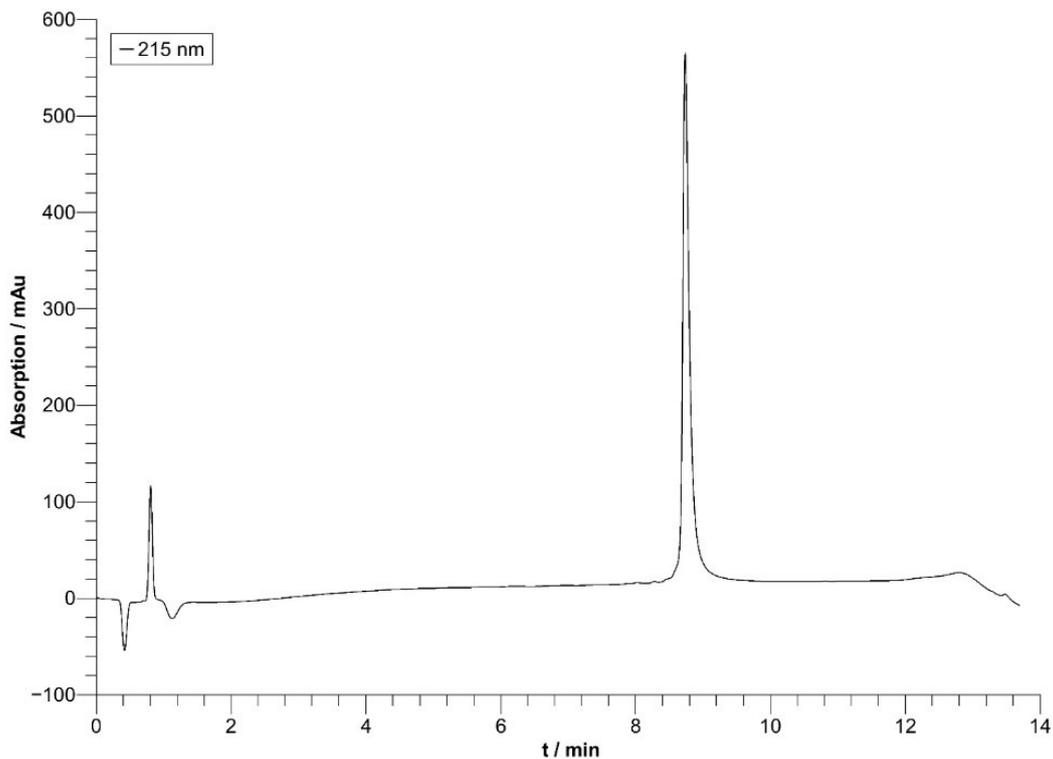
| Aminosäure | $\delta(\text{NH})$ / ppm | $\delta(\alpha)$ / ppm | $\delta(\beta)$ / ppm | $\delta(\gamma)$ / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|--|
| Pro ¹ | n.b. | 4.21 | 2.27, 1.97 | 1.87, 1.81 | δ : 3.31 |
| Phe ² | n.b. | 4.82 | 3.30, 3.00 | - | δ : 7.23 ϵ, ζ : 7.43 |
| Gln ³ | 8.87 | n.b. | 2.01, 1.89 | 2.42, 2.11 | ϵ : 7.63 |
| Cys ⁴ | 8.76 | 4.26 | 3.06, 2.74 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.10 | 4.57 | 4.57 | 1.31 | - |
| Phe ⁶ | 9.01 | 4.34 | 2.49 | - | δ : 6.98 ϵ, ζ : 7.31 |
| Hot ⁷ | 8.93 | 3.57 | 4.09 | 4.09 | δ : 5.06 |
| Tap ⁸ | - | 5.56 | 3.43, 3.01 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.09 | 4.15 | 3.26, 2.88 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.81 | 4.00, 3.88 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 8.05 | 4.01 | 1.62, 1.52 | 1.30 | δ : 1.45 ϵ : 3.05 |
| Arg ¹² | 7.79 | 5.22 | 1.60, 1.55 | 1.46 | δ : 3.06 ϵ : n.b. |
| X ¹³ | 8.50 | 4.90 | 3.12, 3.06 | - | δ : n.b. ϵ : n.b. ζ : 6.78 |
| Ser ¹⁴ | n.b. | 4.53 | 4.04 | - | - |
| Leu ¹⁵ | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | δ : n.b. |
| Asp ¹⁶ | n.b. | n.b. | n.b. | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.54 | 4.19 | 3.32, 2.78 | - | δ : 7.15 ϵ, ζ : 7.31 |
| Asn ¹⁸ | 6.92 | 4.34 | 2.21 | - | δ : n.b. |
| Leu ¹⁹ | 7.20 | 3.77 | 1.99, 1.42 | 1.56 | δ : 1.03, 0.86 |
| Lys ²⁰ | 8.05 | 3.85 | 1.72 | 1.46, 1.30 | δ : 1.75 ϵ : 2.94 |
| Thr ²¹ | 7.56 | 3.79 | 3.99 | 1.10 | - |
| His ²² | 7.65 | 4.17 | 3.24, 2.88 | - | δ^2 : 7.34 ϵ^1 : 8.05 |
| Val ²³ | 8.36 | 3.58 | 2.30 | 1.28 | - |
| Lys ²⁴ | 6.91 | 4.12 | 1.76 | 1.54, 1.42 | δ : 1.65 ϵ : 2.94 |
| Ile ²⁵ | 7.70 | 3.83 | 1.63 | 0.95, 0.90 | γ^{CH_3} : 0.56 δ : 0.69 |
| His ²⁶ | 7.09 | 4.36 | 2.50, 1.64 | - | δ^2 : 6.45, ϵ^1 : 8.12 |

Experimenteller Teil

| | | | | | |
|-------------------|------|------------|------|------|---|
| Thr ²⁷ | 7.71 | 4.28 | 4.35 | 1.19 | - |
| Gly ²⁸ | 8.05 | 3.94, 3.70 | - | - | - |

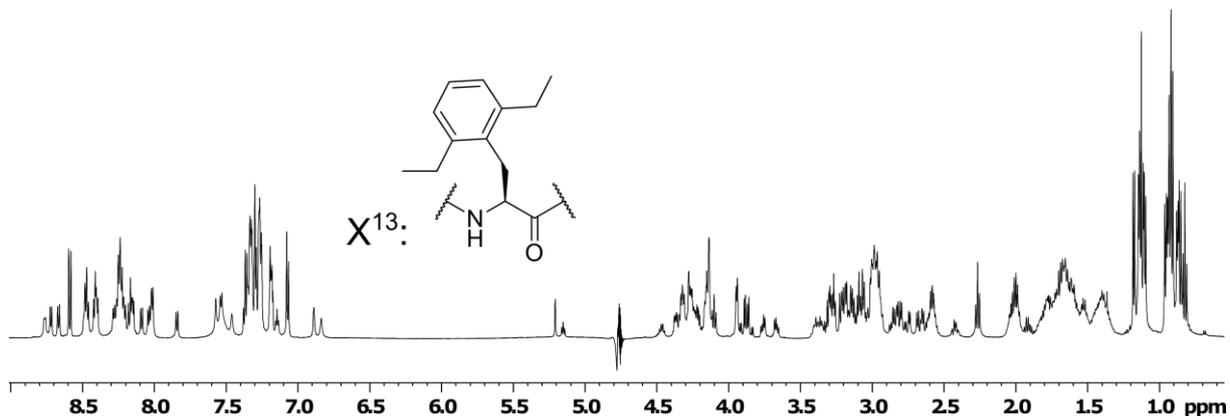
HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₈H₂₂₇N₄₀O₄₁S₃] [M+3H]³⁺: 1106.2034, gef.: 1106.2017

rp-HPLC: tr = 8.73 min (15% - 40% MeCN in 10 min, 0.45 mL/min).



ZFV-17 (PXDI-095)

Die Mutation von F¹³ zu δ , δ' -Diethylphenylalanin führt, nach der Zugabe von 1.5 eq Zink und Erhöhung des pH-Werts zu einem definierten Satz an Signalen. Diese weisen charakteristische Zinkfinger-Signale auf. Die unzureichende spektroskopische Qualität ermöglicht jedoch keine Zuordnung der Signale. Daher erfolgt die Zuordnung der *apo*-Verbindung.



¹H-NMR: 600 MHz, 300K, H₂O/D₂O 9:1, pH = 3.2, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

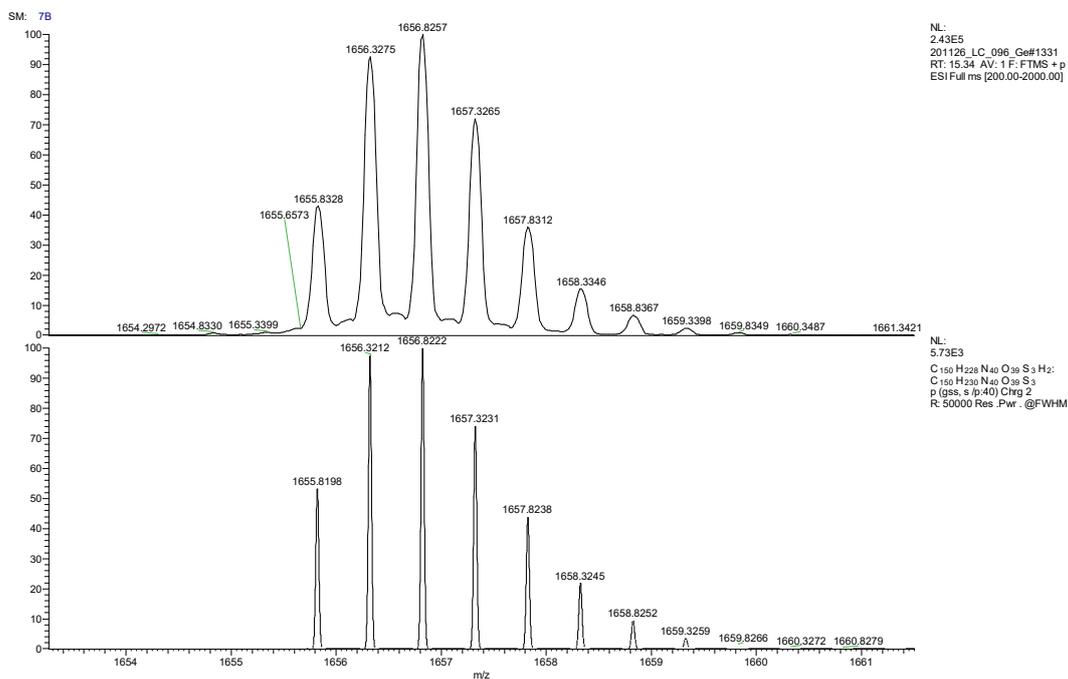
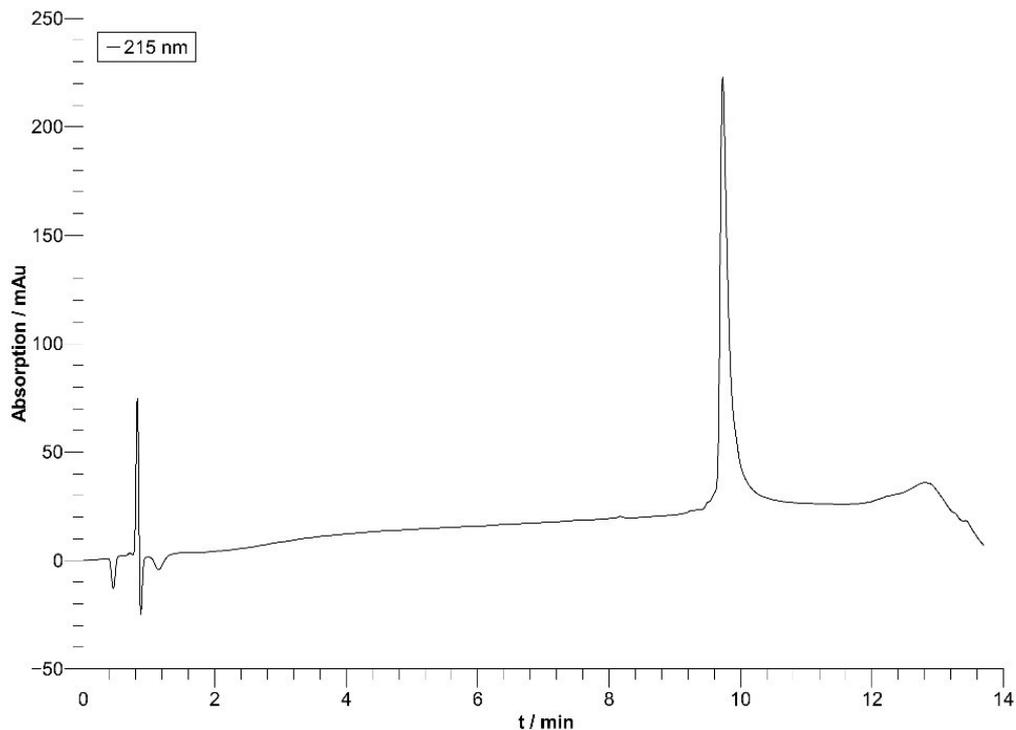
| Aminosäure | $\delta(\text{NH})$ / ppm | $\delta(\alpha)$ / ppm | $\delta(\beta)$ / ppm | $\delta(\gamma)$ / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|--|
| Pro ¹ | n.b. | 4.32 | 2.43, 2.27 | 2.00, 1.91 | δ : 3.38 |
| Phe ² | 8.72 | 4.65 | 3.08 | - | δ , ϵ , ζ : 7.33 |
| Gln ³ | 8.40 | 4.33 | 2.00, 1.92 | 2.27 | ϵ : 7.46, 6.84 |
| Cys ⁴ | 8.41 | 4.46 | 2.84 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.16 | 4.32 | 4.16 | 1.10 | - |
| Phe ⁶ | 8.15 | 4.75 | 3.19, 2.99 | - | δ : 7.26 ϵ , ζ : 7.34 |
| Hot ⁷ | 8.76 | 4.14 | 4.28 | 4.27 | δ : 5.21 |
| Tap ⁸ | - | 5.15 | 3.31 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.41 | 4.48 | 2.97 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.48 | 3.95 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 8.04 | 4.26 | 1.75 | 1.38 | δ : 1.69 ϵ : 2.99 |
| Arg ¹² | 8.24 | 4.29 | 1.72 | 1.54 | δ : 3.15 ϵ : 7.14 |
| X ¹³ | 8.28 | 4.47 | 3.21, 3.08 | - | δ -CH ₂ : 2.59 δ -CH ₂ -CH ₃ : 1.13 ϵ : 7.08 ζ : 7.18 |
| Ser ¹⁴ | 7.54 | 4.37 | 3.76, 3.67 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 8.24 | 4.23 | 1.60 | 1.53 | δ : 0.94 |
| Asp ¹⁶ | 8.21 | 4.59 | 2.76, 2.65 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.01 | 4.49 | 3.08, 2.97 | - | δ : 7.19 ϵ , ζ : 7.32 |
| Asn ¹⁸ | 8.25 | 4.62 | 2.68 | - | δ : 7.57, 6.89 |
| Leu ¹⁹ | 8.02 | 4.25 | 1.63 | 1.60 | δ : 0.91 |
| Lys ²⁰ | 8.24 | 4.33 | 1.75 | 1.43 | δ : 1.65 ϵ : 2.99 |
| Thr ²¹ | 7.84 | 4.27 | 4.15 | 1.14 | - |
| His ²² | 8.48 | 4.73 | 3.28, 3.18 | - | δ^2 : 7.28 ϵ^1 : 8.59 |
| Val ²³ | 8.09 | 4.11 | 2.03 | 0.91 | - |
| Lys ²⁴ | 8.46 | 4.34 | 1.79 | 1.41 | δ : 1.72 ϵ : 2.98 |

Experimenteller Teil

| | | | | | |
|-------------------|------|------|------|------|-------------------------------|
| Ile ²⁵ | 8.17 | 4.16 | 1.81 | 1.41 | γ^{CH_3} : 0.86 |
| His ²⁶ | 8.67 | n.b. | 3.24 | - | δ^2 : 7.30 |
| Thr ²⁷ | 8.23 | 4.37 | 4.21 | 1.81 | ϵ^1 : 8.60 |
| Gly ²⁸ | 8.23 | 3.89 | - | - | - |

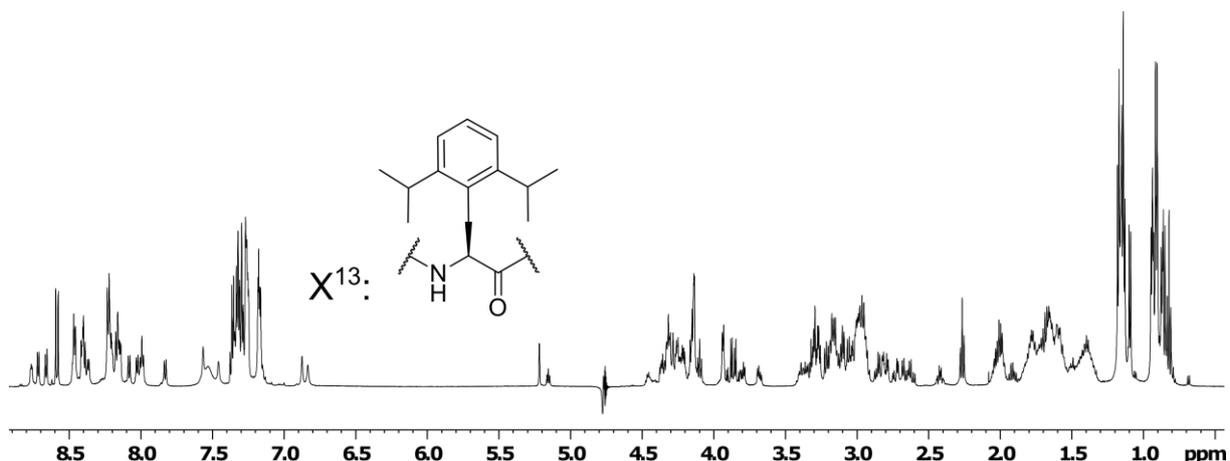
HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₅₀H₂₃₀N₄₀O₃₉S₃] [M+2H]²⁺: 1656.8222, gef.: 1656.8257

rp-HPLC: tr = 9.72 min (15% - 40% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



ZFV-18 (PXDI-100)

Ähnlich wie Verbindung ZFV-17 zeigt diese Verbindung bei Zugabe von Zink und Erhöhung des pH-Wertes charakteristische Faltungssignale. Durch 2D-Spektroskopie konnte jedoch nur ungefähr 30% der Struktur zugeordnet werden. Daher erfolgte die Charakterisierung der Struktur ohne Zink (*apo*)



¹H-NMR: 600 MHz, 300K, H₂O/D₂O 9:1, pH = 3.3, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

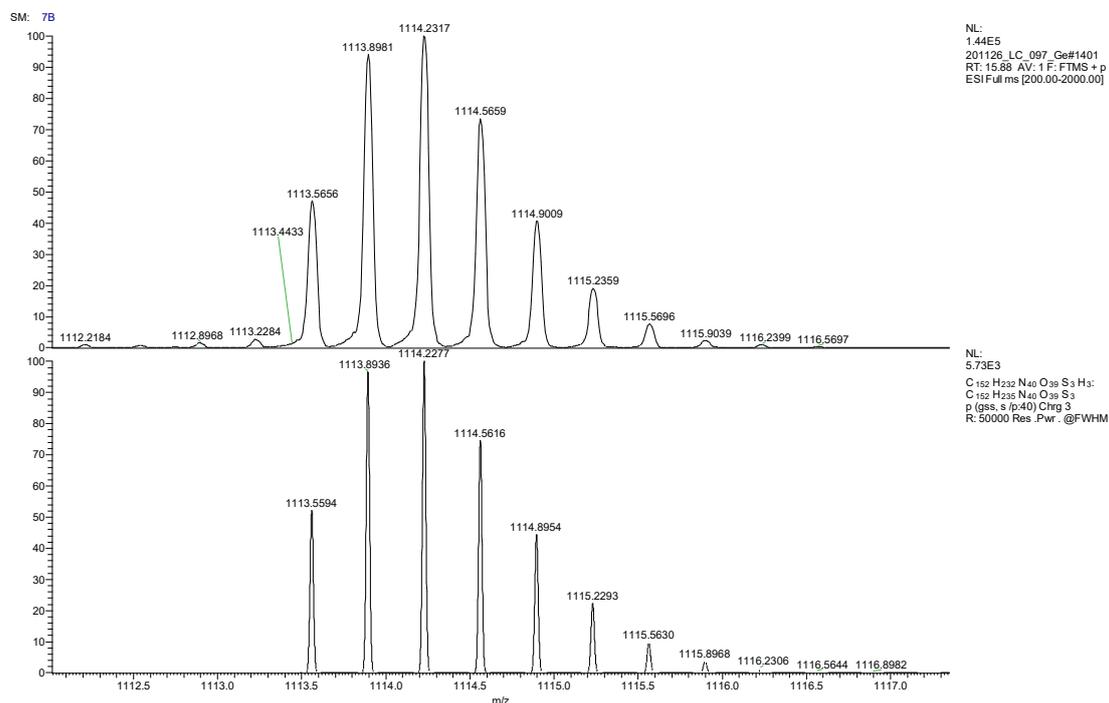
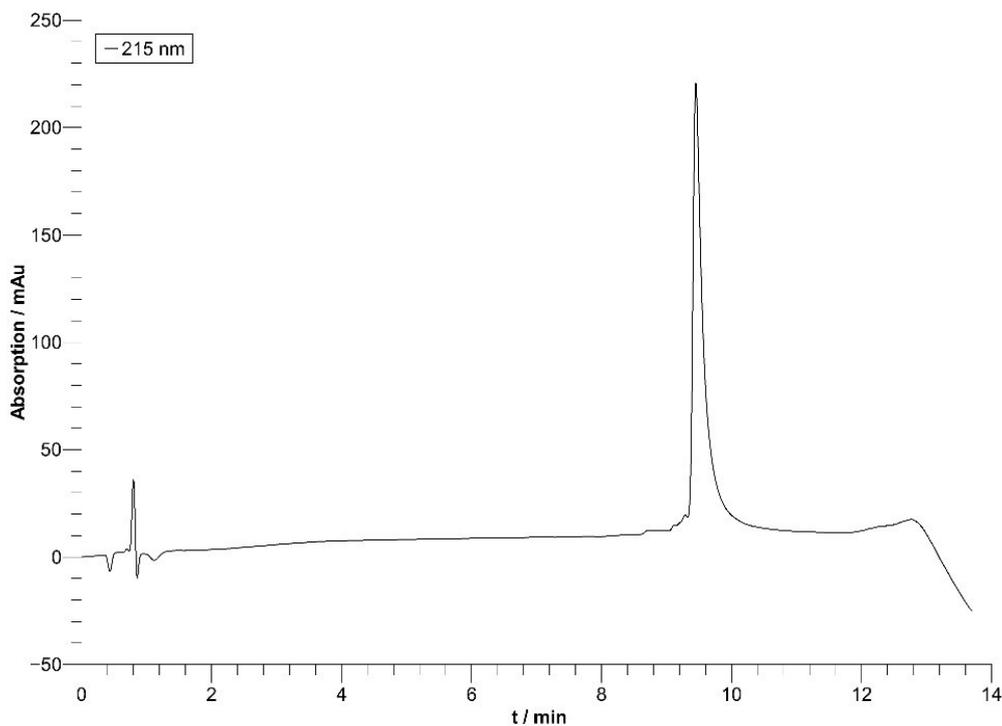
| Aminosäure | δ(NH) / ppm | δ(α) / ppm | δ(β) / ppm | δ(γ) / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|-------------|------------|------------|------------|---|
| Pro ¹ | n.b. | 4.32 | 2.42, 2.27 | 2.00, 1.91 | δ: 3.38 |
| Phe ² | 8.72 | 4.65 | 3.08 | - | δ, ε, ζ: n.b. |
| Gln ³ | 8.39 | 4.33 | 2.00, 1.91 | 2.27 | ε: 7.46, 6.84 |
| Cys ⁴ | 8.41 | 4.46 | 3.02, 2.95 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.15 | 4.31 | 4.15 | 1.10 | - |
| Phe ⁶ | 8.15 | 4.75 | 3.19, 2.99 | - | δ: 7.25 ε, ζ: 7.17 |
| Hot ⁷ | 8.76 | 4.14 | 4.29 | 4.28 | δ: 5.22 |
| Tap ⁸ | - | 5.16 | 3.31 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.41 | 4.46 | 2.84 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.47 | 3.94 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 8.03 | 4.26 | 1.72 | 1.38 | δ: 1.67 ε: 2.97 |
| Arg ¹² | 8.20 | 4.31 | 1.76 | 1.57 | δ: 3.16 ε: 7.16 |
| X ¹³ | 8.37 | 4.42 | 3.30, 3.16 | - | δ-CH: 1.16 δ-CH-CH ₃ : 0.85 ε: 7.17 ζ: 7.27 |
| Ser ¹⁴ | 7.35 | 4.36 | 3.80, 3.69 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 8.22 | 4.22 | 1.60 | 1.50 | δ: 0.93 |
| Asp ¹⁶ | 8.17 | 4.57 | 2.73, 2.62 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 7.99 | 4.45 | 3.04, 2.94 | - | δ: 7.17 ε, ζ: 7.27 |
| Asn ¹⁸ | 8.23 | 4.61 | 2.80, 2.67 | - | δ: 7.57, 6.88 |
| Leu ¹⁹ | 8.00 | 4.25 | 1.63 | 1.60 | δ: 0.93, 0.87 |
| Lys ²⁰ | 8.23 | 4.30 | 1.78 | 1.46 | δ: 1.67 ε: 2.98 |
| Thr ²¹ | 7.83 | 4.26 | 4.15 | 1.14 | - |
| His ²² | 8.46 | 4.72 | 3.28, 3.18 | - | δ ² : 7.28 ε ¹ : 8.58 |
| Val ²³ | 8.08 | 4.10 | 2.03 | 0.91 | - |
| Lys ²⁴ | 8.46 | 4.34 | 1.78 | 1.40 | δ: 1.71 |

Experimenteller Teil

| | | | | | |
|-------------------|------|------|------|------|---|
| Ile ²⁵ | 8.17 | 4.15 | 1.80 | 1.16 | ε: 3.00 γ ^{CH₃} : 0.85 |
| His ²⁶ | 8.66 | 4.80 | 3.23 | - | δ: 0.85 δ ² : 7.30 |
| Thr ²⁷ | 8.23 | 4.37 | 4.21 | 1.18 | ε ¹ : 8.60 |
| Gly ²⁸ | 8.20 | 3.87 | - | - | - |

HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₅₀H₂₃₅N₄₀O₃₉S₃] [M+3H]³⁺: 1114.2277, gef.: 1114.2317

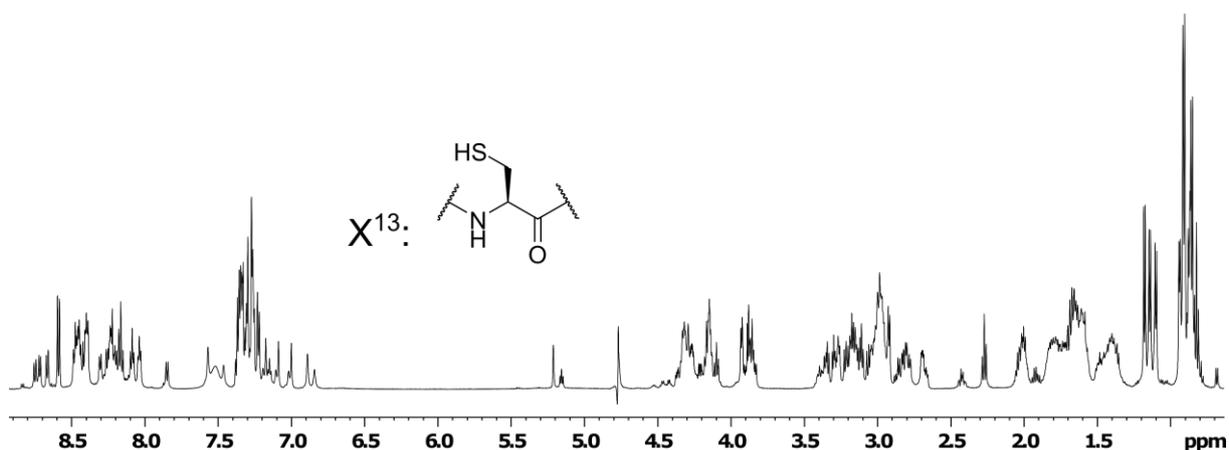
rp-HPLC: tr = 9.46 min (20% - 40% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



7.3 Zusätzliche Zinkfingerpeptide

Im Folgenden sollen noch drei weitere Zinkfingervarianten beschrieben werden, deren Vorkommen im Hauptteil dieser Arbeit sich nicht in die Narrative einbinden ließ. Zu Beginn der Untersuchungen von Zinkfingerpeptiden wurden die Bedeutung des zentralen Phenylalanins der 13. Position durch Mutationen untersucht. Hierbei wurden neben den, im Hauptteil vorgestellten Derivaten noch Cystein, Diphenylalanin und Phenylglycin untersucht. Keines der Peptide konnte eine stabile Tertiärstruktur ausbilden, weshalb sämtliche chemische Verschiebungsangaben sich auf die jeweilige *apo*-Verbindung beziehen. Die Phenylglycin¹³-Variante (ZFV-21) zeigt zwar ein Signalmuster, welches dem klassischen Zinkfingerstrukturmotiv ähnlich sieht, zweidimensionale NMR-Methoden erlaubten jedoch keine eindeutige Zuordnung.

ZFV-19 (PXDI-014)



¹H-NMR: 600 MHz, 300K, H₂O/D₂O 9:1, pH = 3.2, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

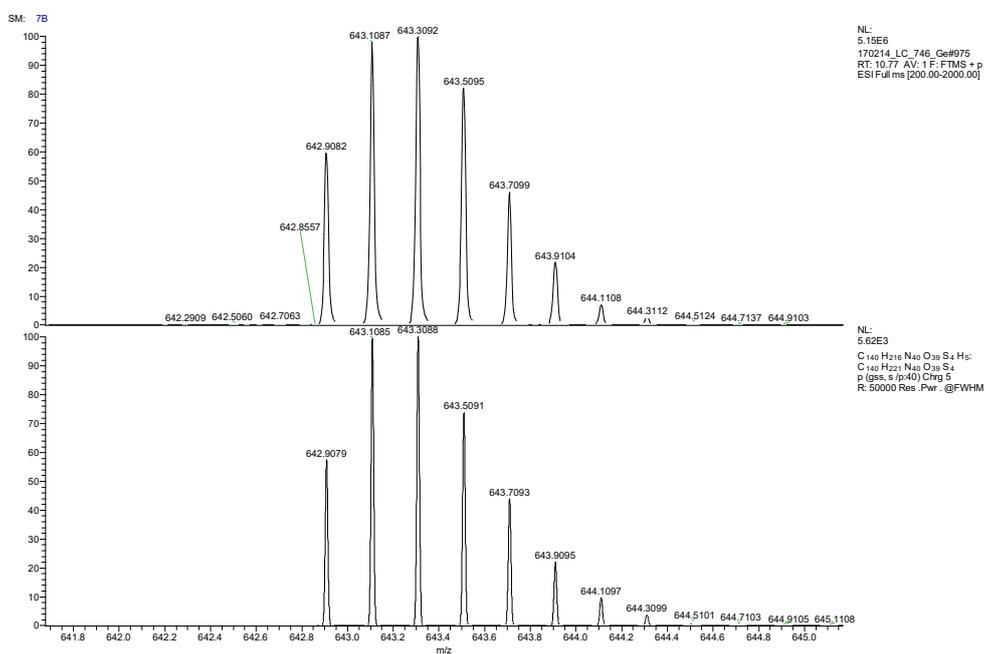
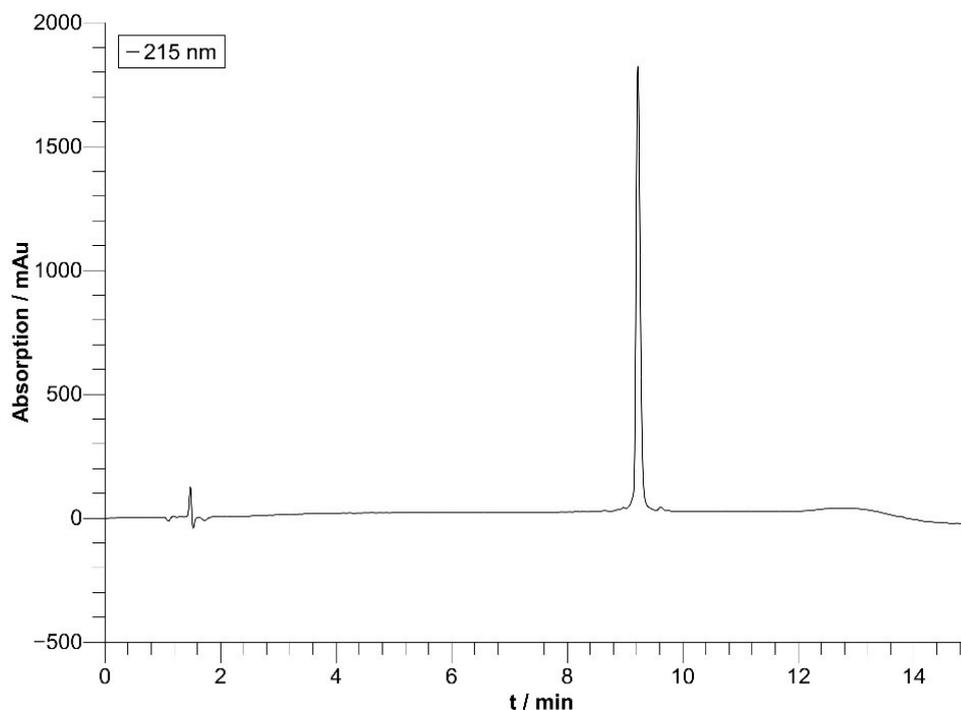
| Aminosäure | δ(NH) / ppm | δ(α) / ppm | δ(β) / ppm | δ(γ) / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|-------------|------------|------------|------------|--|
| Pro ¹ | n.b. | 4.32 | 2.42, 2.27 | 2.00 | δ: 3.37 |
| Phe ² | 8.72 | 4.64 | 3.11, 3.06 | - | δ, ε, ζ: 7.23 |
| Gln ³ | 8.39 | 4.32 | 2.01, 1.92 | 2.27 | ε: 7.47, 6.84 |
| Cys ⁴ | 8.41 | 4.47 | 2.92, 2.83 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.15 | 4.32 | 4.15 | 1.10 | - |
| Phe ⁶ | 8.17 | 4.15 | 3.19, 2.99 | - | δ, ε, ζ: 7.23 |
| Hot ⁷ | 8.75 | 4.15 | 4.28 | 4.26 | δ: 5.21 |
| Tap ⁸ | - | 5.16 | 3.32 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.45 | 4.45 | 3.03, 2.95 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.47 | 3.93 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 8.03 | 4.26 | 1.81 | 1.38 | δ: 1.70 ε: 2.97 |
| Arg ¹² | 8.40 | 4.32 | 1.83, 1.75 | 1.60 | δ: 3.15 ε: n.b. |
| Cys ¹³ | 8.39 | 4.53 | 2.92 | - | - |
| Ser ¹⁴ | 8.44 | 4.45 | 3.86 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 8.20 | 4.32 | 1.58 | 1.48 | δ: 0.89, 0.84 |
| Asp ¹⁶ | 8.23 | 4.63 | 2.80, 2.68 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.08 | 4.52 | 3.13, 3.03 | - | δ, ε, ζ: 7.27 |
| Asn ¹⁸ | 8.30 | 4.63 | 2.81, 2.70 | - | δ: 7.56, 6.89 |
| Leu ¹⁹ | 8.04 | 4.26 | 1.61 | 1.39 | δ: 0.93, 0.88 |
| Lys ²⁰ | 8.26 | 4.32 | 1.81 | 1.41 | δ: 1.67 ε: 2.99 |
| Thr ²¹ | 7.85 | 4.26 | 4.14 | 1.14 | - |
| His ²² | 8.48 | 3.94 | 3.27, 3.17 | - | δ ² : 7.30 ε ¹ : 8.58 |

Experimenteller Teil

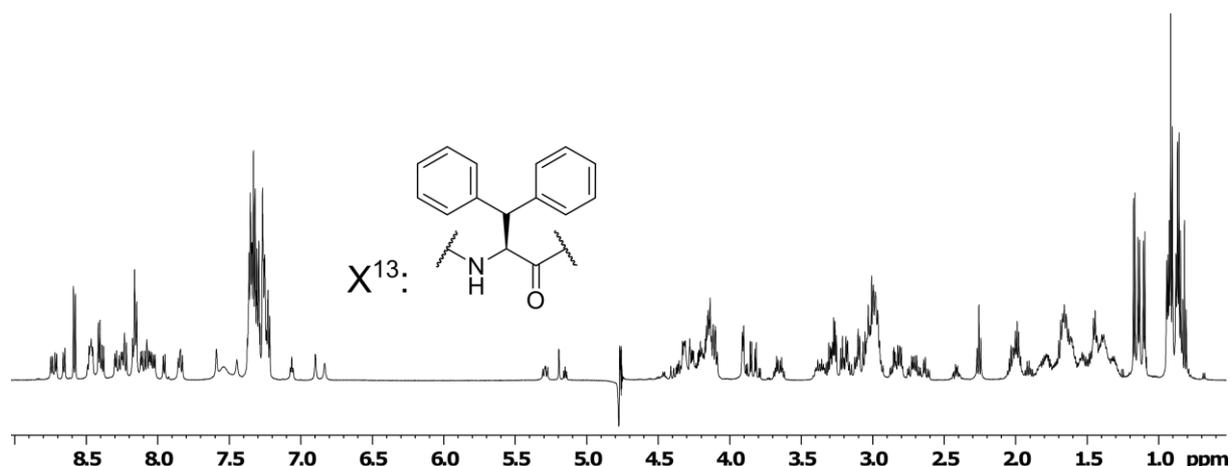
| | | | | | |
|-------------------|------|------|------------|------|------------------------------------|
| Val ²³ | 8.03 | 4.28 | 1.39 | 0.89 | - |
| Lys ²⁴ | 8.46 | 4.34 | 1.78 | 1.40 | δ: 1.69 |
| Ile ²⁵ | 8.17 | 4.16 | 1.80 | 1.40 | ε: 2.95 |
| His ²⁶ | 8.67 | 4.80 | 3.28, 3.21 | - | γ ^{CH₃} : 0.85 |
| Thr ²⁷ | 8.23 | 4.36 | 4.20 | 1.18 | δ: 0.85 |
| Gly ²⁸ | 8.22 | 3.87 | - | - | δ ² : 7.27 |
| | | | | | ε ¹ : 8.60 |

HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₀H₂₂₁N₄₀O₃₉S₄] [M+5H]⁵⁺: 643.3088, gef.: 643.3092

rp-HPLC: tr = 9.23 min (10% - 40% MeCN in 10 min, 0.45 mL/min).



ZFV-20 (PXDI-083)

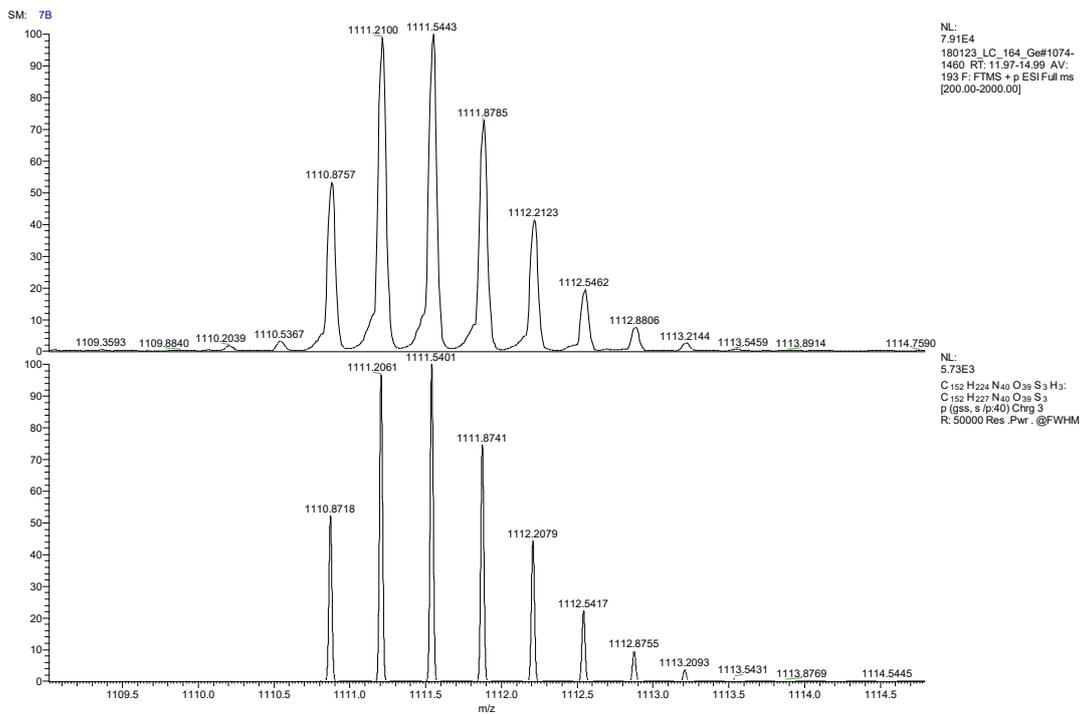
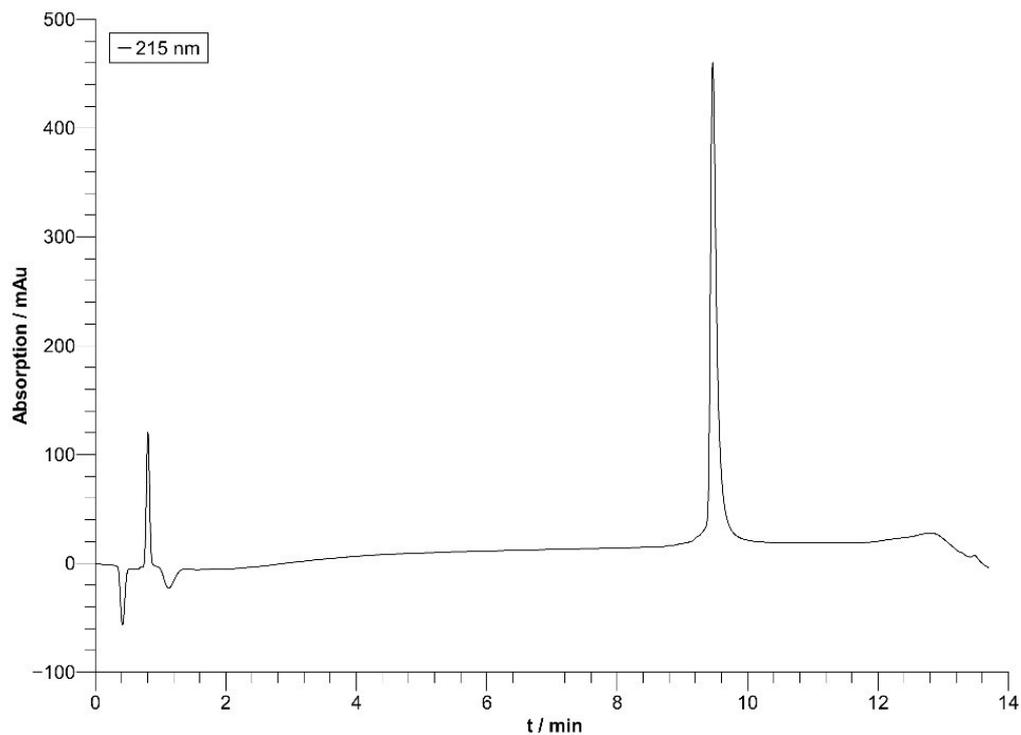


¹H-NMR: 600 MHz, 300K, H₂O/D₂O 9:1, pH = 3.2, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

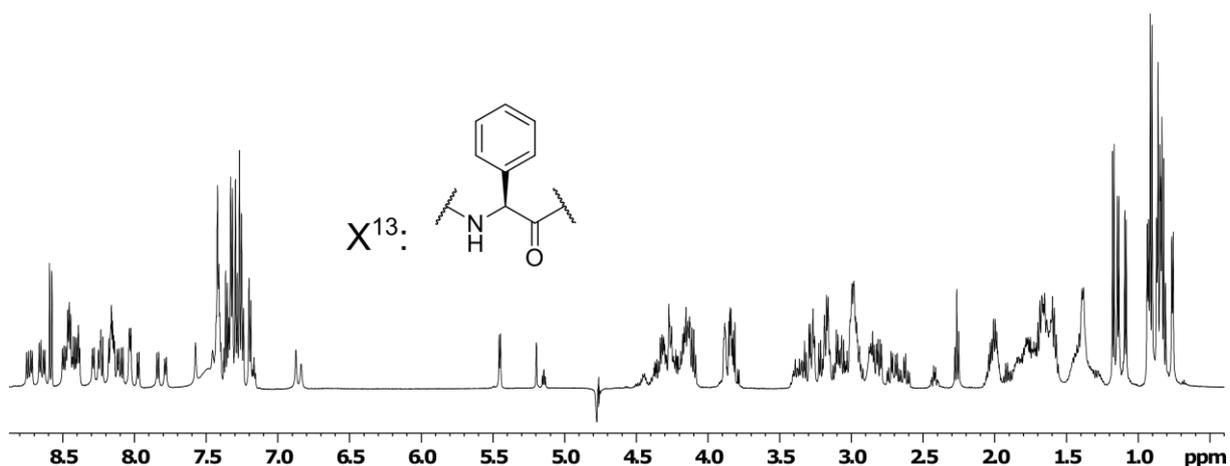
| Aminosäure | δ(NH) / ppm | δ(α) / ppm | δ(β) / ppm | δ(γ) / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|-------------|------------|------------|------------|--|
| Pro ¹ | n.b. | 4.31 | 2.42, 2.26 | 1.99 | δ: 3.37 |
| Phe ² | 8.71 | 4.64 | 3.08 | - | δ, ε, ζ: 7.34 |
| Gln ³ | 8.38 | 4.32 | 1.98, 1.91 | 2.26 | ε: 7.44, 6.83 |
| Cys ⁴ | 8.41 | 4.46 | 2.97, 2.84 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.15 | 4.32 | 4.16 | 1.11 | - |
| Phe ⁶ | 8.15 | 4.74 | 3.19, 2.98 | - | δ, ε, ζ: 7.26 |
| Hot ⁷ | 8.74 | 4.13 | 4.28 | 4.26 | δ: 5.21 |
| Tap ⁸ | - | 5.16 | 3.29 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.41 | 4.46 | 2.97, 2.84 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.48 | 3.91 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 7.95 | 4.18 | 1.63 | 1.33 | δ: 1.61 ε: 2.97 |
| Arg ¹² | 8.07 | 4.12 | 1.35 | 1.54 | δ: 3.04 ε: 7.06 |
| X ¹³ | 8.26 | 5.29 | 4.40 | - | δ: 7.33 ε, ζ: 7.23 |
| Ser ¹⁴ | 8.15 | 4.20 | 3.66 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 7.85 | 4.20 | 1.58 | 1.45 | δ: 0.89 |
| Asp ¹⁶ | 8.11 | 4.56 | 2.73, 2.62 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.05 | 4.50 | 3.12, 3.02 | - | δ, ε, ζ: 7.23 |
| Asn ¹⁸ | 8.29 | 4.62 | 2.82, 2.69 | - | δ: 7.59, 6.90 |
| Leu ¹⁹ | 8.02 | 4.25 | 1.63 | 1.46 | δ: 0.90 |
| Lys ²⁰ | 8.24 | 4.32 | 1.78 | 1.42 | δ: 1.67 ε: 2.99 |
| Thr ²¹ | 7.83 | 4.26 | 4.14 | 1.14 | - |
| His ²² | 8.46 | 4.72 | 3.28, 3.17 | - | δ ² : 7.29 ε ¹ : 8.59 |
| Val ²³ | 8.09 | 4.11 | 2.02 | 0.91 | - |
| Lys ²⁴ | 8.46 | 4.34 | 1.78 | 1.40 | δ: 1.72 ε: 2.97 |
| Ile ²⁵ | 8.17 | 4.16 | 1.80 | 1.4 | γ ^{CH₃} : 0.85 δ: 0.85 |
| His ²⁶ | 8.65 | 4.79 | 3.24 | - | δ ² : 7.27 ε ¹ : 8.58 |
| Thr ²⁷ | 8.22 | 4.36 | 4.22 | 1.17 | - |
| Gly ²⁸ | 8.15 | 3.84 | - | - | - |

HPLC-MS (ESI+): ber. für $[C_{152}H_{227}N_{40}O_{39}S_3] [M+3H]^{3+}$: 1111.5401, gef.: 1111.5443

rp-HPLC: tr = 9.47 min (15% - 40% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



ZFV-21 (PXDI-085)


 $^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 300K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH = 3.0, n.b = nicht bestimmbar, - = nicht vorhanden.

| Aminosäure | $\delta(\text{NH})$ / ppm | $\delta(\alpha)$ / ppm | $\delta(\beta)$ / ppm | $\delta(\gamma)$ / ppm | δ sonstige / ppm |
|-------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|--|
| Pro ¹ | n.b. | 4.32 | 2.42, 2.227 | 2.00 | δ : 3.38 |
| Phe ² | 8.72 | 4.65 | 3.08 | - | δ, ϵ, ζ : n.b. |
| Gln ³ | 8.40 | 4.33 | 1.99, 1.90 | 2.27 | ϵ : 7.46, 6.84 |
| Cys ⁴ | 8.45 | 4.44 | 3.01, 2.95 | - | - |
| Thr ⁵ | 8.15 | 4.30 | 4.14 | 1.09 | - |
| Phe ⁶ | 8.15 | 4.73 | 3.18, 2.97 | - | δ : 7.25 ϵ, ζ : 7.33 |
| Hot ⁷ | 8.75 | 4.13 | 4.28 | 4.28 | δ : 5.20 |
| Tap ⁸ | - | 5.14 | 3.30 | - | - |
| Cys ⁹ | 8.42 | 4.46 | 2.84 | - | - |
| Gly ¹⁰ | 8.44 | 3.89 | - | - | - |
| Lys ¹¹ | 7.97 | 4.26 | 1.78, 1.69 | 1.42, 1.30 | δ : 1.61 ϵ : 2.87 |
| Arg ¹² | 8.39 | 4.39 | 1.87, 1.76 | 1.63 | δ : 3.17 ϵ : 7.17 |
| X ¹³ | 8.63 | 5.46 | - | - | δ : 7.42 ϵ, ζ : 7.24 |
| Ser ¹⁴ | 8.50 | 4.48 | 3.84 | - | - |
| Leu ¹⁵ | 7.79 | 4.18 | - | 1.39 | δ : 0.84, 0.76 |
| Asp ¹⁶ | 8.11 | 4.57 | 2.73, 2.62 | - | - |
| Phe ¹⁷ | 8.03 | 4.50 | 3.09, 2.99 | - | δ : 7.20 ϵ, ζ : 7.32 |
| Asn ¹⁸ | 8.29 | 4.62 | 2.81, 2.77 | - | δ : 7.57, 6.88 |
| Leu ¹⁹ | 8.03 | 4.25 | 1.63 | 1.63 | δ : 0.90 |
| Lys ²⁰ | 8.25 | 4.32 | 1.78 | 1.42 | δ : 1.70 ϵ : 2.99 |
| Thr ²¹ | 7.84 | 4.27 | 4.15 | 1.14 | - |
| His ²² | 8.47 | 4.72 | 3.28, 3.17 | - | δ^2 : 7.29 ϵ^1 : 8.59 |
| Val ²³ | 8.09 | 4.10 | 2.03 | 0.91 | - |
| Lys ²⁴ | 8.46 | 4.34 | 1.71 | 1.41 | δ : 1.69 ϵ : 3.00 |
| Ile ²⁵ | 8.17 | 4.16 | 1.81 | 1.39 | γ^{CH_3} : 0.86 δ : 0.86 |
| His ²⁶ | 8.67 | n.b. | 3.24 | - | δ^2 : 7.27 ϵ^1 : 8.58 |
| Thr ²⁷ | 8.23 | 4.37 | 4.22 | 1.17 | - |

Experimenteller Teil

Gly²⁸

8.16

3.84

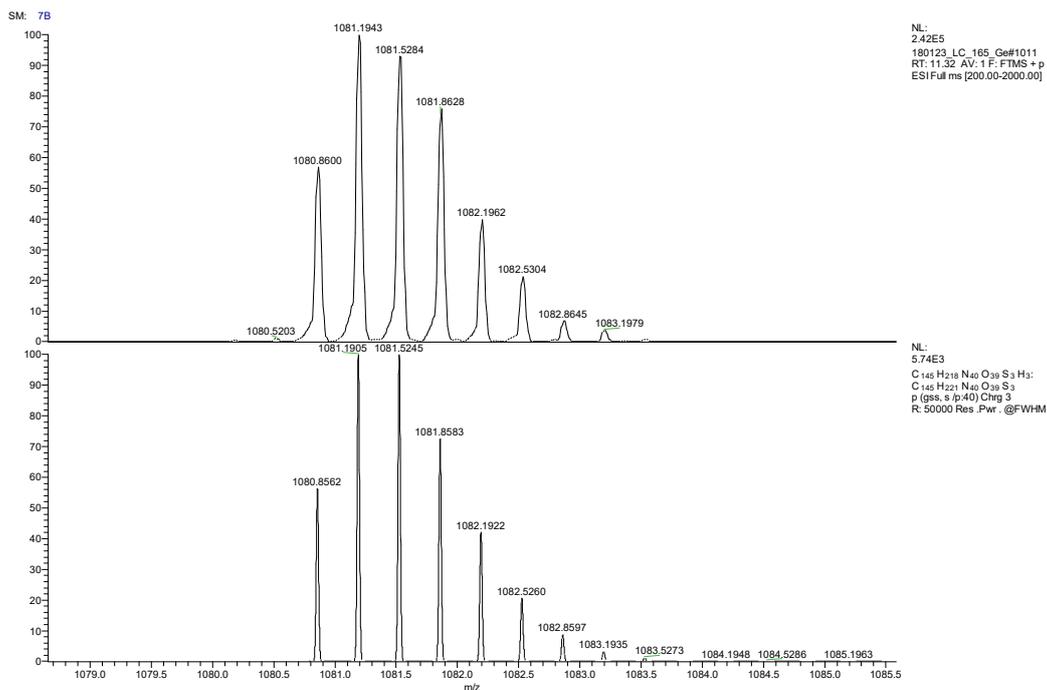
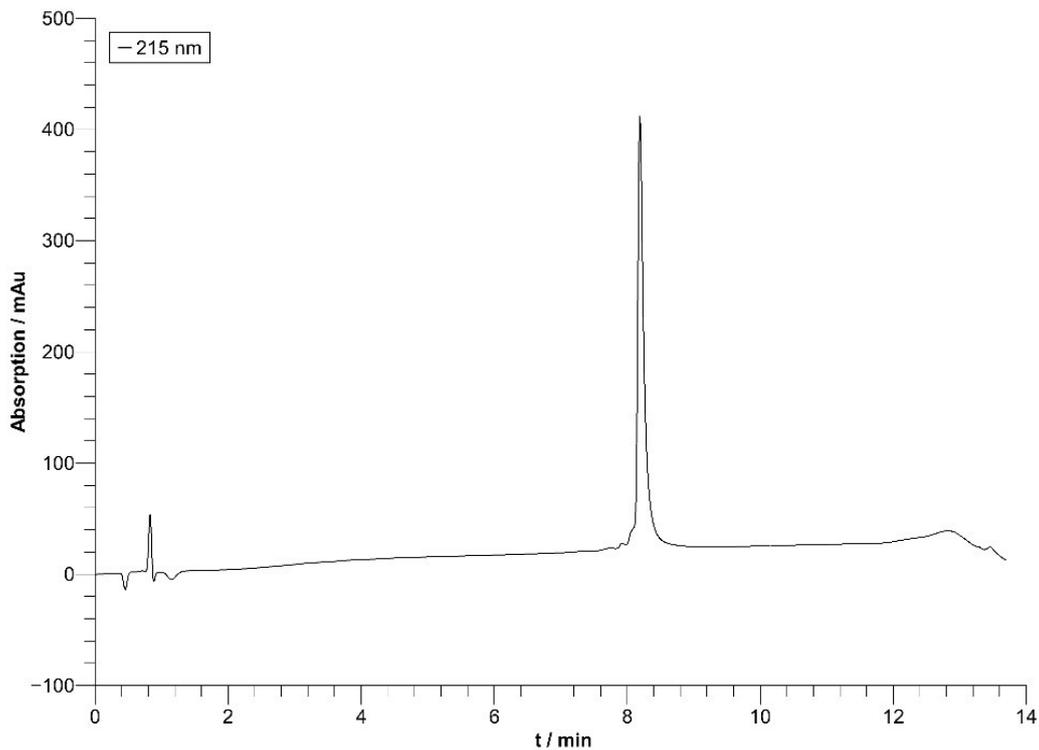
-

-

-

HPLC-MS (ESI+): ber. für [C₁₄₅H₂₂₁N₄₀O₃₉S₃] [M+3H]³⁺: 1081.5245, gef.: 1081.5284

rp-HPLC: tr = 8.19 min (15% - 40% MeCN in 10min, 0.45 mL/min).



7.4 Allgemeine Anmerkungen zu den theoretischen Methoden

NMR-Strukturberechnungen

Die NMR-Strukturbestimmung der Peptide wurde mit der *Xplor-NIH*-Programmsuite^[400] durchgeführt. Abstands-Restraints wurden aus NOESY-Spektren mit einer Mischzeit von 300 ms extrahiert. Die Kreuzsignale wurden entsprechend ihrer Intensität als schwach, mittel oder stark eingeteilt. Die Berechnungen starteten von einer erweiterten Konformation unter Verwendung des Protokolls der *dihedralangle-simulated-annealing*-Berechnung von STEIN *et al.*^[401] Die Ausgangsstrukturen wurden entweder nach ihren synthetischen Vorbildern nur mit einer Schutzgruppe am N-Terminus (Scharnier-Peptid von SCHRIMPF *et al.*) oder mit beiden Termini *g capped* (Zinkfinger, β,β -Diarylaminosäurehybrid) simuliert. Das System wurde auf 3500 K aufgeheizt und in 12.5 K-Schritten abgekühlt. Anstelle des Standard-Xplor-Kraftfeldes wurde das implizite Kraftfeld *eefx2*^[402] gewählt, da es eine höhere Genauigkeit und Qualität der berechneten Strukturen im Vergleich zum nativen Zustand aufweist. Anschließend wurde eine Verfeinerung der Struktur durchgeführt mit dem Skript *eefx_refine.py* durchgeführt, wobei die Restriktion der NOE-Kontakte als „soft“ bewertet wurde. Die energieniedrigste Konformation wurde als Startstruktur für die Moleküldynamik-Simulationen verwendet. Der Einbau des Hot=Tap-Motivs erforderte die Erstellung zweier neuer Aminosäuretopologien, die nach erfolgreichem Aufbau der gestreckten Struktur durch einen *patch* miteinander verbunden wurden. Dieser Workaround war erforderlich, um eine korrekte Verknüpfung des Hot=Taps mit weiteren Aminosäuren zu ermöglichen. Eine weitere Modifikation wurde benötigt, um die tetraedrische Koordinationssphäre des Zink-Ions im Zinkfingerpeptid exakt darstellen zu können. Beide Skripte, sowie die Topologie des Hot=Tap-Bausteins für NMR-Strukturberechnungen sind hier aufgelistet. Da sämtliche Berechnungen innerhalb des Xplor-NIH-Programms auf dem *eefx2*-Kraftfeld basierten, welches seinerseits auf dem CHARMM-Formalismus basiert, wurden die Parameter für die Toly- und Xylyl-Aminosäuren von *charmm-gui* übertragen. Diese Topologien sind explizit in dieser Arbeit nicht dargestellt, da sie erstens sich in digitaler Form im Archiv auf den Rechner der Arbeitsgruppe GEYER befinden und zweitens innerhalb weniger Stunden durch *charmm-gui*^[433] erstellt und auf das Xplor-Format übertragen werden können.

Patch zur tetraedrischen Koordinationssphäre in Zinkfingerpeptiden:

```

PRESidue C2HED
GROUP
delete ATOM 1HG end
MODIfy ATOM 1CB      CHARge= 0.19 END
MODIfy ATOM 1SG TYPE=S1 CHARge=-0.19 END
ATOM 1ZN      TYPE=ZN CHARge=+2.0 END
GROUP
delete ATOM 2HG end
MODIfy ATOM 2CB      CHARge= 0.19 END
MODIfy ATOM 2SG TYPE=S2 CHARge=-0.19 END
GROUP
delete ATOM 3HE2 end ! zusätzlich dazu
add  ATOM 3HD1 TYPE=H  CHARge= 0.450 END
MODIfy ATOM 3NE2 TYPE=NR23 CHARge=-0.40 END
MODIfy ATOM 3CE1 TYPE=CPXX CHARge= 0.00 END
MODIfy ATOM 3ND1 TYPE=NR1 CHARge= -0.450 END
GROUP
delete ATOM 4HE2 end ! zusätzlich dazu
add  ATOM 4HD1 TYPE=H  CHARge= 0.450 END
MODIfy ATOM 4NE2 TYPE=NR24 CHARge=-0.40 END
MODIfy ATOM 4CE1 TYPE=CPXX CHARge= 0.00 END
MODIfy ATOM 4ND1 TYPE=NR1 CHARge= -0.450 END

add bond 1ZN 1SG
add bond 1ZN 2SG
add bond 1ZN 3NE2
add bond 1ZN 4NE2
add bond 3HD1 3ND1
add bond 4HD1 4ND1

add angle 1SG 1ZN 2SG
add angle 1SG 1ZN 3NE2
add angle 1SG 1ZN 4NE2
add angle 2SG 1ZN 3NE2
add angle 2SG 1ZN 4NE2
add angle 3NE2 1ZN 4NE2
add angle 1ZN 1SG 1CB
add angle 1ZN 2SG 2CB
add angle 1ZN 3NE2 3CE1
add angle 1ZN 3NE2 3CD2
add angle 1ZN 4NE2 4CE1
add angle 1ZN 4NE2 4CD2
add angle 3HD1 3ND1 3CG
add angle 4HD1 4ND1 4CG
add angle 3HD1 3ND1 3CE1
add angle 4HD1 4ND1 4CE1

add improper 3NE2 3CE1 3CD2 1ZN
add improper 4NE2 4CE1 4CD2 1ZN
add improper 3ND1 3CG 3CE1 3HD1
add improper 4ND1 4CG 4CE1 4HD1

END

```

Topologie für den Hydroxythreonin-Teil des Hot=Tap β -turn-Mimetikums:

residue HOT

group

atom N type=NH1 charge=-0.470 end !

atom HN type=H charge= 0.310 end !

atom CA type=CH6 charge= 0.120 end !

atom HA type=HH6 charge= 0.090 end !

group !

atom CB type=CH7 charge= 0.129 end !

atom HB1 type=HH7 charge= 0.090 end !

atom OB type=OH7 charge=-0.653 end !

atom HOB type=HHOH7 charge= 0.419 end !

group

atom CG type=CH8 charge= 0.154 end !

atom HG1 type=HH8 charge= 0.090 end !

atom OG type=OH8 charge=-0.662 end !

atom HOG type=HHOH8 charge= 0.419 end !

group

atom CD type=CH8A charge= 0.182 end !

atom HD1 type=HH8A charge= 0.090 end !

atom HD2 type=HH8A charge= 0.000 end !

atom HD3 type=HH8A charge= 0.000 end !

group

atom C type=CHT charge= 0.466 end !

atom O type=OHT charge=-0.515 end !

bond N HN

bond N CA bond CA HA

bond CA CB bond CB HB1 bond CB OB bond OB HOB

bond CB CG bond CG HG1 bond CG OG bond OG HOG

bond CG CD bond CD HD1 bond CD HD2 bond CD HD3

bond CA C bond C O

improper HA N C CB !chirality CA

improper HB1 OB CA CG !stereo CB

!improper C2 CA N2 O2

!improper SE HD1 CG N2 !stereo 8a

improper OG HG1 CB CD !stereo 8

DONO HN N

ACCE O C

end

Topologie für den Hydroxythreonin-Teil des Hot=Tap β -turn-Mimetikums:

```

residue TAP
group
atom N type=NHC charge=-0.392 end !
atom HN type=H charge= 0.310 end !
atom CA type=CH3 charge= 0.012 end !
atom HA type=HH3 charge= 0.090 end !
group
atom CF type=CH2 charge=-0.088 end !
atom HF1 type=HH2 charge= 0.090 end !
atom HF2 type=HH2 charge= 0.090 end !
atom SE type=S charge=-0.169 end !
atom HSE type=HS charge= 0.000 end !
group
atom C type=C charge= 0.510 end
atom O type=O charge=-0.510 end

bond N HN
bond N CA bond CA HA
bond CA CF bond CF HF2 bond CF HF1
bond CF SE bond CA C bond SE HSE
bond C O

! improper SE HD1 CG N2 !stereo 8a

improper HA N C CF !chirality CA

DONO HN N
ACCE O C
end

```

fold.py-Skript zur Berechnung von Zinkfingerpeptiden.

Bis auf die Modifikationen durch die Hot=Tap- und Zink-Patches entspricht es dem Faltungsskript für Proteine aus der *Xplor*-NIH-Suite. Zwar verlangten die in dieser Arbeit untersuchten Peptidsysteme eine Dimerisierung über Disulfidbrücken, sowie die Verwendung von D-Aminosäuren, jedoch kann eine gute Dokumentation für die entsprechenden Modifikationen auf der Webseite des Programms gefunden werden.

```

xplor.requireVersion("2.33")

import protocol

numberOfStructures=128

outfilename = 'SCRIPT_STRUCTURE.pdb'

protocol.initRandomSeed()

import eefxPotTools
eefxPotTools.initEEFx()

```

```

from psfGen import seqToPSF
seqToPSF("protG.seq",startResid=0,segName='A',amidate_ cterm=True )
command = xplor.command
xplor.command("""
topology
AUTO ANGLE=False DIHEdral=False END
end
patch C2HED
    reference=1=( resid 4)
    reference=2=( resid 9)
    reference=3=( resid 22)
    reference=4=( resid 26)
end
patch HTB
    reference=1=( resid 7)
    reference=2=( resid 8)
end
""")
protocol.addUnknownAtoms()
protocol.fixupCovalentGeom(maxIters=5000,useVDW=10)

protocol.genExtendedStructure()

from potList import PotList
potList = PotList()
crossTerms = PotList('cross')

from simulationTools import MultRamp, StaticRamp
hiTempParams = []
rampedParams = []

from noePotTools import create_NOEPot
noe = create_NOEPot('noe', 'noe.tbl')
potList.append(noe)
rampedParams.append(MultRamp(2.0,30.0, "noe.setScale( VALUE )"))

from torsionDBPotTools import create_TorsionDBPot
torsionDBPot = create_TorsionDBPot('tDB')
potList.append( torsionDBPot )
rampedParams.append( MultRamp(.002,2,"torsionDBPot.setScale(VALUE)") )

from xplorPot import XplorPot
for term in ('BOND', 'ANGL', 'IMPR'):
    potList.append( XplorPot(term) )
    pass

potList['ANGL'].setThreshold(5.0) # default is 2.0
potList['IMPR'].setThreshold(5.0) # default is 2.0

rampedParams.append(MultRamp(0.4, 1.0, "potList['ANGL'].setScale(VALUE)"))
rampedParams.append(MultRamp(0.1, 1.0, "potList['IMPR'].setScale(VALUE)"))

from eefxPotTools import create_EEFxPot, param_LK
eefxpot=create_EEFxPot("eefxpot")
eefxpot.setVerbose(False)

```

```

potList.append(eefxpot)
rampedParams.append(MultRamp(0.1,1.0,"eefxpot.setScale(VALUE)"))
rampedParams.append(StaticRamp("potList['VDW'].setScale(0)"))

potList.append( XplorPot("VDW") )
hiTempParams.append(StaticRamp("""protocol.initNBond(cutnb=100,
                                rcon=0.04,
                                tolerance=45,
                                nbxmod=5,
                                repel=1.2,
                                onlyCA=True)"""))
hiTempParams.append(StaticRamp("potList['VDW'].setScale(1)"))
hiTempParams.append(StaticRamp("eefxpot.setScale(0)"))

from ivm import IVM
dyn = IVM()
protocol.torsionTopology(dyn)

minc = IVM()
protocol.cartesianTopology(minc)

temp_ini = 3500.0
temp_fin = 25.0

protocol.massSetup()

def calcOneStructure(loopInfo):
    """Calculate a structure.

    """
    from monteCarlo import randomizeTorsions
    randomizeTorsions(dyn)
    protocol.fixupCovalentGeom(maxIters=100, useVDW=1)

    from simulationTools import InitialParams
    InitialParams(rampedParams)
    InitialParams(hiTempParams)

    protocol.initMinimize(dyn,
                          potList=[term for term in potList
                                    if term.instanceName()!="eefxpot"],
                          numSteps=50,
                          printInterval=10)
    dyn.run()

    protocol.initDynamics(dyn,
                          potList=[term for term in potList
                                    if term.instanceName()!="eefxpot"],
                          bathTemp=temp_ini,
                          initVelocities=1,
                          finalTime=400, # run for finalTime or
                          numSteps=4000,
                          printInterval=100)

    dyn.setETolerance(temp_ini/100)
    dyn.run()

```

```

protocol.initNBond()

protocol.initDynamics(dyn,
    potList=[term for term in potList
              if term.instanceName()!="eefxpot"],
    bathTemp=temp_ini,
    finalTime=40,
    numSteps=800,
    printInterval=10)

dyn.setETolerance(temp_ini/100)
dyn.run()

InitialParams(rampedParams)

protocol.initMinimize(dyn,
    potList=potList,
    numSteps=200,
    printInterval=10)
dyn.run()

protocol.initDynamics(dyn,
    potList=potList,
    bathTemp=temp_ini,
    initVelocities=1,
    finalTime=30, # run for finalTime or
    numSteps=30000,
    printInterval=100)

dyn.setETolerance(temp_ini/100)
dyn.run()

InitialParams(rampedParams)

protocol.initDynamics(dyn,
    potList=potList,
    finalTime=0.4,
    numSteps=201,
    printInterval=100)

from simulationTools import AnnealIVM
AnnealIVM(initTemp=temp_ini,
    finalTemp=temp_fin,
    tempStep=12.5,
    ivm=dyn,
    rampedParams=rampedParams).run()

protocol.initMinimize(dyn,
    potList=potList,
    printInterval=50)
dyn.run()

protocol.initMinimize(minc,

```

```

        potList=potList,
        dEPred=10)
    minc.run()

```

```

from simulationTools import FinalParams
from simulationTools import StructureLoop
StructureLoop(numStructures=numberOfStructures,
              doWriteStructures=True,
              averagePotList=potList,
              averageContext=FinalParams(rampedParams),
              pdbTemplate=outfilename,
              structLoopAction=calcOneStructure,
              genViolationStats=True,
              averageTopFraction=0.20,
              averageFilename="SCRIPT_ave.pdb",
              ).run()

```

Exemplarisch soll für die NMR-Restraint eine Auflistung für **ZFV-12** erfolgen:

```

set echo=false end
set wrnlev=0 end

```

```

assign (residue 1 and name HA) (residue 2 and name HD#) 2.5 0.7 0.5
assign (residue 2 and name HA) (residue 3 and name HN) 2.5 0.7 0.5
assign (residue 2 and name HB#) (residue 19 and name HD1#) 2.5 0.7 0.5
assign (residue 3 and name HA) (residue 4 and name HN) 2.5 0.7 0.5
assign (residue 3 and name HB#) (residue 4 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 3 and name HG#) (residue 4 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 4 and name HA) (residue 5 and name HN) 2.5 0.7 0.5
assign (residue 4 and name HB#) (residue 13 and name HE2) 2.5 0.7 0.5
assign (residue 4 and name HA) (residue 19 and name HD1#) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 4 and name HB#) (residue 11 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 4 and name HB#) (residue 13 and name HE2) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 4 and name HB#) (residue 22 and name HD2) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 4 and name HN ) (residue 11 and name O ) 2.0 0.4 0.4
assign (residue 5 and name HN) (residue 6 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 5 and name HA) (residue 6 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 6 and name HA) (residue 7 and name HN) 2.5 0.7 0.5
assign (residue 6 and name HN) (residue 5 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 6 and name HD#) (residue 7 and name HN) 4.0 1.0 0.7
assign (residue 6 and name HD#) (residue 26 and name HE1) 4.0 1.0 0.7
assign (residue 7 and name HB1) (residue 6 and name HD#) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 7 and name HB1) (residue 6 and name HE#) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 7 and name HB1) (residue 9 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 7 and name HD#) (residue 9 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 8 and name HA) (residue 9 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 9 and name HB#) (residue 10 and name HN) 2.5 0.7 0.5
assign (residue 9 and name HB#) (residue 26 and name HE1) 2.5 0.7 0.5
assign (residue 9 and name HN) (residue 10 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 9 and name HA) (residue 10 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 9 and name HB#) (residue 6 and name HD#) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 9 and name HN ) (residue 6 and name O ) 2.0 0.4 0.4
assign (residue 10 and name HN) (residue 9 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 10 and name HN) (residue 11 and name HN) 3.0 1.2 0.7

```

assign (residue 11 and name HA) (residue 12 and name HN) 2.0 0.4 0.4
 assign (residue 11 and name HN) (residue 10 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 11 and name HD#) (residue 13 and name HZ) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 11 and name HG#) (residue 12 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 11 and name HG#) (residue 13 and name HZ) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 12 and name HA) (residue 13 and name HN) 2.5 0.7 0.5
 assign (residue 12 and name HB#) (residue 13 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 13 and name HB#) (residue 18 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 13 and name HE2) (residue 22 and name HD2) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 13 and name HZ) (residue 22 and name HB#) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 13 and name HN) (residue 2 and name O) 2.0 0.4 0.4
 assign (residue 15 and name HD#) (residue 16 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 15 and name HG) (residue 16 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 16 and name HB#) (residue 21 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 17 and name HA) (residue 20 and name HN) 4.0 1.0 0.7
 assign (residue 18 and name HB#) (residue 13 and name HM1#) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 18 and name HN) (residue 17 and name HN) 4.0 1.0 0.7
 assign (residue 18 and name HA) (residue 21 and name HN) 4.0 1.0 0.7
 assign (residue 19 and name HN) (residue 18 and name HN) 2.5 0.7 0.5
 assign (residue 19 and name HD1#) (residue 4 and name HA) 2.5 0.7 0.5
 assign (residue 19 and name HD1#) (residue 13 and name HD2) 2.5 0.7 0.5
 assign (residue 19 and name HD1#) (residue 13 and name HE2) 2.5 0.7 0.5
 assign (residue 19 and name HD1#) (residue 22 and name HD2) 2.5 0.7 0.5
 assign (residue 19 and name HD2#) (residue 13 and name HD2) 2.5 0.7 0.5
 assign (residue 19 and name HN) (residue 20 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 19 and name HA) (residue 13 and name HD2) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 19 and name HA) (residue 20 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 19 and name HA) (residue 22 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 19 and name HB#) (residue 16 and name HA) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 19 and name HB#) (residue 20 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 19 and name HD1#) (residue 4 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 19 and name HD1#) (residue 23 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 19 and name HD2#) (residue 20 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 19 and name HD1#) (residue 3 and name HN) 4.0 1.0 0.7
 assign (residue 19 and name HD1#) (residue 13 and name HZ) 4.0 1.0 0.7
 assign (residue 19 and name HD1#) (residue 20 and name HN) 4.0 1.0 0.7
 assign (residue 20 and name HN) (residue 19 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 20 and name HN) (residue 21 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 20 and name HA) (residue 23 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 20 and name HB#) (residue 21 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 21 and name HN) (residue 20 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 21 and name HA) (residue 22 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 21 and name HB) (residue 22 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 21 and name HG2#) (residue 22 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 22 and name HN) (residue 21 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 22 and name HN) (residue 23 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 22 and name HB#) (residue 19 and name HA) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 22 and name HB#) (residue 13 and name HM2#) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 22 and name HB#) (residue 23 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 22 and name HD2) (residue 23 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 23 and name HA) (residue 26 and name HD2) 2.5 0.7 0.5
 assign (residue 23 and name HG#) (residue 22 and name HD2) 2.5 0.7 0.5
 assign (residue 23 and name HN) (residue 22 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 23 and name HN) (residue 24 and name HN) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 23 and name HA) (residue 22 and name HD2) 3.0 1.2 0.7
 assign (residue 23 and name HB) (residue 26 and name HD2) 3.0 1.2 0.7

```

assign (residue 23 and name HG#) (residue 24 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 23 and name HG#) (residue 26 and name HD2) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 23 and name HN) (residue 22 and name HD2) 4.0 1.0 0.7
assign (residue 24 and name HN) (residue 23 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 24 and name HN) (residue 25 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 24 and name HA) (residue 25 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 24 and name HA) (residue 26 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 24 and name HA) (residue 27 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 24 and name HB#) (residue 25 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 25 and name HN) (residue 24 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 25 and name HN) (residue 26 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 25 and name HB) (residue 26 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 25 and name HD1#) (residue 22 and name HE1) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 25 and name HD1#) (residue 26 and name HE1) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 25 and name HG2#) (residue 22 and name HE1) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 25 and name HA) (residue 26 and name HN) 4.0 1.0 0.7
assign (residue 26 and name HN) (residue 25 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 26 and name HN) (residue 27 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 26 and name HB#) (residue 6 and name HE#) 3.0 1.2 0.7 !2
assign (residue 26 and name HB#) (residue 22 and name HE1) 3.0 1.2 0.7 !2
assign (residue 26 and name HB#) (residue 27 and name HN) 3.0 1.2 0.7 !3
assign (residue 26 and name HD2) (residue 22 and name HD2) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 27 and name HN) (residue 26 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 27 and name HN) (residue 28 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 27 and name HA) (residue 28 and name HN) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 27 and name HG2#) (residue 6 and name HE#) 3.0 1.2 0.7
assign (residue 28 and name HN) (residue 27 and name HN) 3.0 1.2 0.7

set echo=true end
set wrnlev=5 end

```

Klassische MD-Simulationen

Moleküldynamik-Simulationen wurden mit dem Programm *Gromacs* der Version 2018.4 unter Berücksichtigung der periodischen Rahmenbedingungen durchgeführt.^[488] Die Wahl des Kraftfelds wurde an die entsprechenden Systeme angepasst, sodass Amber99sb-ildn, CHARMM36 und OPLS-AA/M ihre Anwendung fanden. Sämtliche Bindungen zum Wasserstoff wurden durch den LINCS-Algorithmus eingeschränkt.^[489] Die elektrostatischen Interaktionen wurden durch die Particle Mesh Ewald-Methode berechnet.^[490] Eine Box in Form eines Dodekaeder wurde um das untersuchte System aufgebaut und mit TIP3P (CHARMM36, OPLS-AA/M) oder TIP4P (Amber99sb-ildn) Wassermolekülen gefüllt. Um eine physiologische Salzkonzentration nachzuahmen, wurden Teile der Wassermoleküle mit Natrium-Ionen und Chlorid-Ionen substituiert, sodass eine Gesamtkonzentration von 0.15 M, zusätzlich zu den Ladungs-ausgleichenden Ionen erhalten wurde. Anschließend wurde die Energie des Systems mit einem *steepest-descent*-Algorithmus minimiert, wobei entweder 500.000 Schritte durchgeführt wurden oder ein finaler Wert von 50 kJ/mol/nm erreicht wurde. Die Equilibrierung erfolgte sowohl im NVT- als auch im NPT-Ensemble über jeweils 10 ns. Zur Einhaltung der Temperatur wurde der modifizierter BERENDSEN Thermostat *v-rescale* mit einer Kupplungszeit von 0.1 ps verwendet. Die Stabilisierung des Drucks im NPT-Ensemble erfolgte über einen Berendsen Barostat-Routine mit einer Kupplungszeit von 2.0 ps. Während der MD-Simulation ohne Beschränkungen wurde der PARRINELLO-RAHMAN Barostat verwendet. Nach erfolgreichem Abschluss der Simulation wurden periodische Rahmenbedingungen korrigiert und translationale Bewegungen entfernt. Die Befehlskette für die MD-Simulation von Zinkfingerpeptiden, ausgehend von der Startkonformation, die durch NMR-Strukturberechnungen erhalten wurde, ist im Folgenden kurz aufgeführt.

```
gmx_mpi pdb2gmx -ignh -inter -merge all -chainsep ter -water tip4p -f 1.pdb
gmx_mpi editconf -f conf.gro -o conf_newbox.gro -c -d 1.1 -bt dodecahedron
gmx_mpi solvate -cp conf_newbox.gro -cs tip4p.gro -o conf_solv.gro -p topol.top
gmx_mpi grompp -f ions.mdp -c conf_solv.gro -p topol.top -o ions.tpr -maxwarn 1
####
```

Der Zusatz von „-maxwarn 1“ ist notwendig, da sich Gromacs beschwert, dass unser System noch eine Ladung enthält und unter den bisher gegebenen Bedingungen eine Simulation physikalisch unrealistische Resultate liefern würde. Im nächsten Befehl werden die Ladungen jedoch ausgeglichen.

```
####
gmx_mpi genion -s ions.tpr -o conf_solv_ions.gro -p topol.top -pname NA -nname CL -neutral -conc 0.15
gmx_mpi grompp -f minim.mdp -c conf_solv_ions.gro -p topol.top -o em.tpr
gmx_mpi mdrun -v -deffnm em
gmx_mpi grompp -f nvt.mdp -c em.gro -r em.gro -p topol.top -o nvt.tpr
gmx_mpi mdrun -v -deffnm nvt
gmx_mpi grompp -f npt.mdp -c nvt.gro -r nvt.gro -t nvt.cpt -p topol.top -o npt.tpr
gmx_mpi mdrun -v -deffnm npt
gmx_mpi grompp -f md.mdp -c npt.gro -t npt.gro -p topol.top -o md.tpr
gmx_mpi mdrun -v -deffnm md
```

Anschließend muss die Trajektorie für weitere Analysen noch bereinigt werden. Lösungsmittel und Natriumchlorid werden entfernt, periodische Grenzbedingungen angepasst und Translationen und Rotationen des Systems fixiert.

```

gmx_mpi trjconv -s md.tpr -f md.xtc -pbc nojump -o traj2.xtc -n index.ndx
gmx_mpi trjconv -s md.tpr -f traj2.xtc -fit rot+trans -o traj3.xtc -n index.ndx
### Um anschließend die Trajektorie in VMD betrachten zu können, wird die Topologie benötigt, die
durch eine Beispielstruktur mit korrekter Anzahl an Atomen definiert wird. ###
gmx_mpi trjconv -f md.gro -s md.tpr -o new.gro -n index.ndx

```

Der Inhalt der jeweiligen *.mdp-Dateien stammt aus den exzellenten Tutorials von Dr. JUSTIN LEMKUL (mdtutorials.com/gmx) und wurde für die entsprechenden Systeme angepasst:

ions.mdp:

```

integrator = steep
emtol     = 1000.0
emstep    = 0.01
nsteps    = 50000
nstlist    = 1
cutoff-scheme = Verlet
ns_type    = grid
coulombtype = PME
rcoulomb   = 1.2
rvdw       = 1.2
pbc        = xyz

```

minim.mdp:

```

integrator = steep
emtol     = 50.0
emstep    = 0.01
nsteps    = 500000
nstlist    = 1
cutoff-scheme = Verlet
ns_type    = grid
coulombtype = PME
rcoulomb   = 1.2
rvdw       = 1.2
pbc        = xyz

```

nvt.mdp:

```

define          = -DPOSRES
integrator      = md
nsteps          = 5000000
dt              = 0.002
nstxout         = 500
nstvout         = 500
nstenergy       = 500
nstlog          = 500
continuation    = no
constraint_algorithm = lincs
constraints     = h-bonds
lincs_iter      = 1
lincs_order     = 4
cutoff-scheme  = Verlet
ns_type         = grid
nstlist         = 10
rcoulomb        = 1.2
rvdw            = 1.2

```

```

DispCorr      = EnerPres
coulombtype   = PME
pme_order     = 4
fourierspacing = 0.16
tcoupl        = V-rescale
tc-grps       = Protein Non-Protein
tau_t         = 0.1  0.1
ref_t         = 300  300
pcoupl        = no
pbc           = xyz
gen_vel       = yes
gen_temp      = 300
gen_seed      = -1

```

npt.mdp:

```

define        = -DPOSRES
integrator     = md
nsteps        = 5000000
dt            = 0.002
nstxout       = 500
nstvout       = 500
nstenergy     = 500
nstlog        = 500
continuation  = yes
constraint_algorithm = lincs
constraints    = h-bonds
lincs_iter    = 1
lincs_order   = 4
cutoff-scheme = Verlet
ns_type       = grid
nstlist       = 10
rcoulomb      = 1.2
rvdw          = 1.2
DispCorr      = EnerPres
coulombtype   = PME
pme_order     = 4
fourierspacing = 0.16
tcoupl        = V-rescale
tc-grps       = Protein Non-Protein
tau_t         = 0.1  0.1
ref_t         = 300  300
pcoupl        = Berendsen
pcoupltype    = isotropic
tau_p         = 2.0
ref_p         = 1.0
compressibility = 4.5e-5
refcoord_scaling = com
pbc           = xyz
gen_vel       = no

```

md.mdp:

```

integrator     = md
nsteps        = 130000000
dt            = 0.002
nstxout       = 0
nstvout       = 0

```

```

nstfout          = 0
nstenergy        = 2500
nstlog           = 2500
nstxout-compressed = 2500
compressed-x-grps = System
continuation     = yes
constraint_algorithm = lincs
constraints      = h-bonds
lincs_iter      = 1
lincs_order     = 4
cutoff-scheme   = Verlet
ns_type         = grid
nstlist         = 10
rcoulomb        = 1.2
rvdw            = 1.2
coulombtype     = PME
pme_order       = 4
fourierspacing = 0.16
tcoupl         = V-rescale
tc-grps        = Protein Non-Protein
tau_t          = 0.1 0.1
ref_t          = 300 300
pcoupl         = Parrinello-Rahman
pcoupltype     = isotropic
tau_p          = 2.0
ref_p          = 1.0
compressibility = 4.5e-5
pbc            = xyz
DispCorr       = EnerPres
gen_vel        = no

```

Wohl-temperierte Metadynamiken

Zur Steigerung des konformationellen *samplings* wurde die Methode der Metadynamik von PARRINELLO *et al.*^[360] ausgewählt, wobei der *well-tempered*-Formalismus zur verbesserten Konvergenz angewandt wurde. Das Programm *plumed* in der Version 2.4^[441] wurde mit *Gromacs* 2018.4 kompiliert und diente als Umgebung, um *wt*-Metadynamiken durchzuführen. Die Höhe des Gaußpotenzials wurde an die entsprechenden Systeme angepasst, wobei zunächst ein hohes Potenzial ausgewählt wurde, das bei eventueller Entfaltung der Sekundärstruktur verringert wurde. Dasselbe Verfahren wurde für den *biasfactor* angewandt. Die nachfolgende Tabelle listet die finalen Werte für die, in dieser Arbeit untersuchten Systeme auf.

| Peptid | Höhe | Biasfactor | Breite | Ablagerate |
|---------------------------------|-------|------------|--------|------------|
| 3YY1 | 0.125 | 3 | 0.35 | 1000 |
| ZFV-1 | 0.125 | 3 | 0.35 | 1000 |
| ZFV-8 | 0.125 | 3 | 0.35 | 1000 |
| ZFV-9 | 0.125 | 3 | 0.35 | 1000 |
| ZFV-10 | 0.125 | 6 | 0.35 | 1000 |
| ZFV-12 | 0.125 | 6 | 0.35 | 1000 |
| ZFV-13 | 0.125 | 3 | 0.35 | 1000 |
| Scharnier-Peptid (W-W) | 0.200 | 10 | 0.05 | 500 |
| Scharnier-Peptid (Winkel) | 1.2 | 10 | 0.05 | 500 |
| Scharnier-Peptid (W-W + Winkel) | 0.05 | 5 | 0.05 | 500 |
| SPV-1 | 0.175 | 8 | 0.05 | 500 |
| SPV-2 | 0.175 | 8 | 0.05 | 500 |
| IgG-Modell-Peptid | 1.200 | 10 | 0.35 | 500 |
| Phenylalanin | 1.200 | 10 | 0.35 | 500 |
| Tryptophan | 1.200 | 10 | 0.35 | 500 |
| Wsf | 1.200 | 10 | 0.35 | 500 |

Der Aufbau der input-Dateien unterscheidet sich zwischen Durchführung der Metadynamiken und Auswertung nur marginal, soll für spezielle Fälle trotzdem aufgelistet werden.

Skript für die Metadynamik eines χ_2 -Winkels der wsf-Diarylaminosäure:

```
WHOLEMOLECULES ENTITY0=1-46
tor1: TORSION ATOMS=9,11,28,29
metad: METAD ARG=tor1 PACE=500 HEIGHT=1.2 SIGMA=0.35 FILE=HILLS
BIASFACTOR=10 GRID_MIN=-pi GRID_MAX=pi GRID_BIN=500 TEMP=300
PRINT STRIDE=500 ARG=tor1,metad.bias FILE=COLVAR
```

Skript für die Erstellung einer zweidimensionalen freien Energiefläche, bestehend aus Winkelverteilung und Distanz im Scharnier-Peptid.

```
MOLINFO STRUCTURE=template.pdb
WHOLEMOLECULES ENTITY0=1-388
W1: CENTER ATOMS=42,43,45,46,48,49,51,53,55
W2: CENTER ATOMS=236,237,239,240,242,243,245,247,249
```

```
first: CENTER ATOMS=76,117
middle: CENTER ATOMS=14,191,208,385
last: CENTER ATOMS=275,316
angle2: ANGLE ATOMS=first,middle,last
dist2: DISTANCE ATOMS=W1,W2
PRINT ARG=dist2,angle2 STRIDE=1 FILE=COLVAR
Hh: HISTOGRAM ARG=angle2,dist2 KERNEL=DISCRETE GRID_MIN=0,0 GRID_MAX=3.5,3.5
GRID_BIN=425,425
Fes: CONVERT_TO_FES GRID=hh TEMP=300
DUMPGRID GRID=fes FILE=fes.dat
```

Skript für „Clustering“ entlang einer Variable:

```
MOLINFO STRUCTURE= reference.pdb
WHOLEMOLECULES ENTITY0=1-388
W1: CENTER ATOMS=42,43,45,46,48,49,51,53,55
W2: CENTER ATOMS=236,237,239,240,242,243,245,247,249
Trp_dist: DISTANCE ATOMS=W1,W2
UPDATE_IF ARG=trp_dist MORE_THAN=2.35 LESS_THAN=2.55
DUMPATOMS ATOMS=1-388 FILE=CONF.gro
UPDATE_IF ARG=trp_dist END
```

Bestimmung der Amidizität einer verdrillten Amidbindung durch die *COSNAR*-Methode (*carbonyl substitution nitrogen atom replacement*)

Eine große Limitation in der Synthese von β,β -Diaryl-Aminosäurehybriden liegt in der Notwendigkeit einer dirigierenden Gruppe. Dies wäre zunächst kein Problem, jedoch erzielt die 8-Aminoquinolingrouppe (8AQ) nicht nur die besten Ausbeuten, sondern auch die besten Selektivitäten. Zwar kann diese Funktionalität in wenigen Schritten ausgehend von der Carbonsäure eingeführt werden, die Wiederherstellung nach erfolgreicher C-H-Aktivierung um den Festphasen-kompatiblen Baustein zu erhalten, ist ein viel beschriebenes Problem in der Literatur. Nicke et al. etablierten eine milde Methode, indem zunächst die Aromatizität des Quinolins durch Reduktion herabgesetzt und anschließend die Funktionalität in einen Harnstoff überführt wird. Dieses System ist labil genug, um durch eine oxidative Aufarbeitung in die entsprechende Carbonsäure überführt zu werden. Der Grund für die Erniedrigung der Stabilität lässt sich auf die verringerte Amidizität zurückführen. SZOSTAK *et al.*^{[491] [492]} etablierten hierbei eine Methode, wodurch dieser Parameter abgeschätzt werden kann. Bereits LENNART NICKE stellte die Durchführung dieser Methode in seiner Dissertation vor,^[473] dennoch soll der Prozess im Detail beschrieben werden. Die *carbonyl substitution nitrogen atom replacement*-Methode (*COSNAR*) Methode folgt dabei folgendem Prinzip:



Schema 2: *In silico* erstellte Strukturen, die zur Berechnung der Amidizität nach dem COSNAR-Prinzip benötigt wurden.

Sämtliche Berechnungen erfolgten mit Gaussian 09 C.01.^[493] Zunächst mussten die entsprechenden Startstrukturen erstellt werden. Da die Kristallstruktur für kleinere Systeme häufig das Energieminimum darstellt, wurde für Verbindung 8AQ-Wsf und das Harnstoff-Derivat die jeweilige Kristallstruktur als Startpunkt ausgewählt. Für die artifiziellen Verbindungen erfolgten die Modifikationen mittels Pymol und anschließender Konformergenerierung durch Frog2. Anschließend wurden sämtliche Konformere (20) mit B3LYP/6-311++G(d,p) in der Gasphase optimiert. Die entsprechenden Input-Dateien sind in diesem Abschnitt aufgeführt. Die Abwesenheit von imaginären Frequenzen wurde als Indiz verwendet, dass die Konformere ein Minimum auf der Energiefläche einnehmen. Die Berechnung der *zero-point-energy* und thermischen Energie erfolgte unter den Standardbedingungen. Diese Energien wurden in die entsprechende Gleichung eingesetzt und ein Wert für die Amidizität der Struktur erhalten. Isoliert betrachtet ist dieser Wert nutzlos, da das entsprechende Bezugssystem fehlt. Als Goldstandard hat sich die Resonanzenergie von Dimethylacetamid in der *community* etabliert. Setzt man beide Energien in Verhältnis zueinander, kann abgeschätzt werden, inwiefern eine Reduktion der Amidizität im untersuchten System vorliegt. Hierzu muss die Gleichung nach Schema 2 noch umgestellt werden

$$\Delta E_{COSNAR}(Amide) = E(Amide) - E(Amine) + E(Carbonyl) - E(Alkan)$$

Am Beispiel des Wsf-8AQ-Amids wurde hierbei eine Energie von -16.6 kcal/mol erhalten. Wird diese mit dem Literaturwert von Dimethylacetamid (-18.3 kcal/mol) ins Verhältnis gesetzt, erhält man eine Amidizität von 91%.

Gaussian-Inputdatei für Optimierung der Kristallstruktur von Wsf-8AQ mit anschließender Frequenzberechnung zur Bestimmung eines Minimums.

```
%chk=len_opt_6-31G*.chk
# opt=(Redundant) freq b3lyp/6-311++G(d,p) geom=PrintInputOrient SCF=tight
```

```
lennart_crystal_opt
```

```
0 1
C 5.995285 4.763141 7.832437
O 7.126575 4.719441 8.268161
N 4.763160 4.701159 8.579877
O 3.514211 4.263634 10.417495
C 3.670153 4.760702 7.672917
O 6.438228 1.862930 11.560371
C 2.287505 4.745148 7.810025
O 4.409513 5.619371 13.276582
C 1.532207 4.861063 6.633887
C 2.121807 4.985619 5.371097
C 3.513473 4.994542 5.228682
C 4.311398 5.115472 3.948182
C 5.715987 5.698575 4.224057
C 6.471120 4.955487 5.340338
N 5.613739 4.883500 6.519421
C 4.232453 4.879799 6.404335
C 4.611668 4.490599 9.964130
C 5.865732 4.581340 10.851831
C 6.368745 6.027397 11.005904
N 5.571038 3.942846 12.130483
C 5.861075 2.580898 12.343536
C 5.314701 2.249952 13.689327
C 5.348436 1.061804 14.402024
C 4.731848 1.047561 15.657072
C 4.107286 2.190861 16.167130
C 4.080389 3.384569 15.438841
C 4.694213 3.387526 14.196765
C 4.826881 4.489448 13.196494
H 1.818631 4.645668 8.776279
H 0.451337 4.854244 6.711558
H 1.490956 5.077670 4.493188
H 6.653652 3.985649 10.390652
H 5.832890 0.181613 13.996722
H 4.735012 0.136859 16.245052
H 3.635727 2.147855 17.142313
H 3.597648 4.274890 15.823527
H 4.409815 4.128126 3.479449
H 3.785433 5.748183 3.228021
H 5.617335 6.751205 4.507948
```

| | | | |
|---|----------|----------|-----------|
| H | 6.736328 | 3.941014 | 5.021303 |
| H | 7.393253 | 5.470006 | 5.613620 |
| H | 7.214591 | 6.037674 | 11.696390 |
| H | 5.593376 | 6.682455 | 11.398324 |
| H | 6.720827 | 6.392048 | 10.042264 |
| H | 6.321362 | 5.665457 | 3.314991 |

Gaussian-Inputdatei für den Scan des χ^2 -Diederwinkels von Tryptophan

```
%chk=phe_min.chk
# b3lyp/6-31G* geom=printinporient scf=tight
```

Dihedral Scan trp low

```
0 1
C 0.715563 0.543020 0.398485
C 0.497225 -0.958800 0.456131
O 1.369430 -1.721138 0.887185
H -0.162233 1.100797 0.059509
H 0.997409 0.891784 1.396577
H 1.556551 0.755890 -0.269316
N -0.701656 -1.403851 0.003529
C -1.141658 -2.796848 0.091144
C -2.681840 -2.860956 0.175960
C -0.592937 -3.677991 -1.066250
O -1.332844 -4.300737 -1.826798
C -3.947740 -0.690022 -0.625639
C -3.412600 -2.016906 -0.836072
C -3.694926 -2.343560 -2.141034
N -4.376968 -1.308508 -2.748774
C -4.547214 -0.276545 -1.849928
C -5.166279 0.968647 -1.997836
C -5.181093 1.815437 -0.895113
C -4.595212 1.430021 0.328277
C -3.982707 0.191118 0.472411
H -1.359347 -0.748186 -0.399883
H -4.696558 -1.309688 -3.704927
H -0.712958 -3.199146 1.017448
H -3.434377 -3.241678 -2.681143
H -5.619297 1.265625 -2.940363
H -5.653892 2.790188 -0.977410
H -4.627691 2.114500 1.171635
H -3.539073 -0.094727 1.423270
H -2.975886 -2.545889 1.183972
H -2.967138 -3.910663 0.068835
N 0.761411 -3.721953 -1.115930
C 1.484707 -4.495632 -2.107534
H 1.272570 -3.193088 -0.409957
H 2.143729 -3.853450 -2.704307
H 2.094270 -5.274059 -1.632738
H 0.753079 -4.968549 -2.764121
```

D 8 9 13 14 S 36 5.0000

Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse wurde zu großen Teilen in GROMACS anhand des exzellenten Tutorials von BERT DE GROOT durchgeführt. Folgende Befehle wurden angewandt:

```
gmx covar -s ref.pdb -f traj2.xtc
```

Hierdurch werden zwei Dateien erstellt, `eigenval.xvg` und `eigenvec.trr`. Aus der `xvg`-Datei kann der entsprechende *scree*-Plot erstellt werden.

```
xmgrace eigenval.xvg
```

```
gmx ana eig -s ref.pdb -f traj2.xtc -extr extremel.pdb -first 1 -last 1 -nframes 120
```

`extremel.pdb` kann nun mit einem molekularen Betrachtungsprogramm der Wahl angesehen und der erste größte Eigenvektor beobachtet werden.

Für die Berechnung der Energiefläche aus **Abbildung 50** wurde das Skript `generateFES.py` von PROF. DR. BIRGIT STRODEL verwendet und leicht angepasst.

8. Literaturverzeichnis

- [1] P. S. Kim, R. L. Baldwin, *Annual review of biochemistry* **1990**, 59, 631.
- [2] C. B. Anfinsen, *Science (New York, N.Y.)* **1973**, 181, 223.
- [3] H. Brown, F. Sanger, R. KITAI, *Biochem J* **1955**, 60, 556.
- [4] F. Sanger, *Biochem J* **1945**, 39, 507.
- [5] K. U. Linderstrøm-Lang, *Proteins and Enzymes*, Stanford University Press, **1952**.
- [6] L. PAULING, R. B. COREY, H. R. Branson, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1951**, 37, 205.
- [7] G. N. Ramachandran, V. Sasisekharan in *Advances in Protein Chemistry* (Hrsg.: C. B. Anfinsen, M. L. Anson, J. T. Edsall, F. M. Richards), Academic Press, **1968**, S. 283–437.
- [8] C. Ramakrishnan, G. N. Ramachandran, *Biophysical Journal* **1965**, 5, 909.
- [9] H. Berman, K. Henrick, H. Nakamura, J. L. Markley, *Nucleic Acids Res* **2007**, 35, D301-3.
- [10] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: chemistry and biology*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
- [11] T. M. Weaver, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2000**, 9, 201.
- [12] M. N. Fodje, S. Al-Karadaghi, *Protein engineering* **2002**, 15, 353.
- [13] B. W. Low, R. B. Baybutt, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 5806.
- [14] P. Kumar, M. Bansal, *The FEBS Journal* **2015**, 282, 4415.
- [15] S. B. Mohapatra, N. Manoj, *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics* **2021**, 1869, 140523.
- [16] L. Nicke, P. Horx, R. Müller, S. Els-Heindl, A. Geyer, *ChemBioChem* **2021**, 22, 330.
- [17] G. L. Millhauser, *Biochemistry* **1995**, 34, 3873.
- [18] A. Bastida, J. Zúñiga, A. Requena, B. Miguel, J. Cerezo, *Journal of Chemical Information and Modeling* **2020**, 60, 6523.
- [19] D. Eisenberg, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, 11207.
- [20] F. Freire, A. M. Almeida, J. D. Fisk, J. D. Steinkruger, S. H. Gellman, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 8894.
- [21] J. M. Scholtz, H. Qian, E. J. York, J. M. Stewart, R. L. Baldwin, *Biopolymers* **1991**, 31, 1463.
- [22] L. Huang, D. M. J. Lilley, *RNA (New York, N.Y.)* **2013**, 19, 1703.
- [23] J. B. Ball, P. F. Alewood, *Journal of molecular recognition : JMR* **1990**, 3, 55.
- [24] P. N. Lewis, F. A. Momany, H. A. Scheraga, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **1973**, 303, 211.
- [25] C. M. Venkatachalam, *Biopolymers* **1968**, 6, 1425.
- [26] C. M. Wilmot, J. M. Thornton, *Journal of Molecular Biology* **1988**, 203, 221.
- [27] J. S. Richardson in *Advances in Protein Chemistry* (Hrsg.: C. B. Anfinsen, M. L. Anson, J. T. Edsall, F. M. Richards), Academic Press, **1968**, S. 167–339.
- [28] A. M. C. Marcelino, L. M. Gierasch, *Biopolymers* **2008**, 89, 380.
- [29] K. S. Rotondi, L. M. Gierasch, *Biopolymers* **2006**, 84, 13.
- [30] M. S. Searle in *Protein science encyclopedia* (Hrsg.: A. Fersht), Wiley, Chichester, **2008**.
- [31] B. L. Sibanda, J. M. Thornton, *Nature* **1985**, 316, 170.
- [32] R. M. Freidinger, D. F. Veber, D. S. Perlow, J. R. Brooks, R. Saperstein, *Science (New York, N.Y.)* **1980**, 210, 656.
- [33] B. Eckhardt, W. Grosse, L.-O. Essen, A. Geyer, *PNAS* **2010**, 107, 18336.
- [34] S. R. Trevino, S. Schaefer, J. M. Scholtz, C. N. Pace, *Journal of Molecular Biology* **2007**, 373, 211.
- [35] S. H. Wang, S. Q. Hu, G. T. Burke, P. G. Katsoyannis, *Journal of protein chemistry* **1991**, 10, 313.

- [36] B. Odaert, F. Jean, C. Boutillon, E. Buisine, O. Melnyk, A. Tartar, G. Lippens, *Protein science : a publication of the Protein Society* **1999**, 8, 2773.
- [37] P. K. Paul, P. A. Burney, M. M. Campbell, D. J. Osguthorpe, *Journal of computer-aided molecular design* **1990**, 4, 239.
- [38] U. Nagai, K. Sato, *Tetrahedron Letters* **1985**, 26, 647.
- [39] S. R. Rao, W. S. Horne, *Peptide Science* **2020**, 112.
- [40] M. Baca, P. F. Alewood, S. B. Kent, *Protein science : a publication of the Protein Society* **1993**, 2, 1085.
- [41] A. A. Fuller, D. Du, F. Liu, J. E. Davoren, G. Bhabha, G. Kroon, D. A. Case, H. J. Dyson, E. T. Powers, P. Wipf et al., *PNAS* **2009**, 106, 11067.
- [42] K. A. Dill, *Biochemistry* **1990**, 29, 7133.
- [43] J. Pilipczuk, B. Zalewska-Piątek, P. Bruździak, J. Czub, M. Wieczór, M. Olszewski, M. Wanarska, B. Nowicki, D. Augustin-Nowacka, R. Piątek, *Journal of Biological Chemistry* **2017**, 292, 16136.
- [44] Z. V. F. Wright, S. McCarthy, R. Dickman, F. E. Reyes, S. Sanchez-Martinez, A. Cryar, I. Kilford, A. Hall, A. K. Takle, M. Topf et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 13063.
- [45] N. L. Daly, K. J. Rosengren, D. J. Craik, *Advanced drug delivery reviews* **2009**, 61, 918.
- [46] A. Klug, *Annual review of biochemistry* **2010**, 79, 213.
- [47] H. R. Bosshard, D. N. Marti, I. Jelesarov, *Journal of molecular recognition : JMR* **2004**, 17, 1.
- [48] L. Lins, R. Brasseur, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **1995**, 9, 535.
- [49] R. S. Spolar, J. H. Ha, M. T. Record, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, 86, 8382.
- [50] S. Woutersen, Y. Mu, G. Stock, P. Hamm, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, 98, 11254.
- [51] R. Biehl, D. Richter, *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal* **2014**, 26, 503103.
- [52] Z. Gáspári, A. Perczel in *Annual Reports on NMR Spectroscopy* (Hrsg.: G. A. Webb), Academic Press, **2010**, S. 35–75.
- [53] G. G. Stokes in *Cambridge library collection. Mathematics* (Hrsg.: G. G. Stokes), Cambridge University Press, Cambridge, **2009**, S. 1–10.
- [54] N. Tjandra, S. E. Feller, R. W. Pastor, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12562.
- [55] R. Ishima, D. A. Torchia, *Nat Struct Mol Biol* **2000**, 7, 740.
- [56] A. G. Palmer, *Chemical reviews* **2004**, 104, 3623.
- [57] A. G. Tzakos, C. R. R. Grace, P. J. Lukavsky, R. Riek, *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **2006**, 35, 319.
- [58] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.
- [59] E. G. Baker, G. J. Bartlett, K. L. Porter Goff, D. N. Woolfson, *Accounts of Chemical Research* **2017**, 50, 2085.
- [60] S. E. Ackerman, N. V. Currier, J. M. Bergen, J. R. Cochran, *Expert review of proteomics* **2014**, 11, 561.
- [61] D. J. Craik, M. Cemazar, C. K. L. Wang, N. L. Daly, *Biopolymers* **2006**, 84, 250.
- [62] H. Kolmar, *Current pharmaceutical design* **2011**, 17, 4329.
- [63] F. Stricher, L. Martin, C. Vita, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2006**, 340, 113.
- [64] C. Vita, J. Vizzavona, E. Drakopoulou, S. Zinn-Justin, B. Gilquin, A. Ménez, *Biopolymers* **1998**, 47, 93.
- [65] J. L. Gifford, M. P. Walsh, H. J. Vogel, *Biochem J* **2007**, 405, 199.
- [66] S. A. Wolfe, L. Nekludova, C. O. Pabo, *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **2000**, 29, 183.
- [67] S. Meier, S. Güthe, T. Kiefhaber, S. Grzesiek, *Journal of Molecular Biology* **2004**, 344, 1051.
- [68] D. J. Craik, N. L. Daly, C. Waine, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **2001**, 39, 43.

- [69] D. D. Smith, K. A. Pratt, I. G. Sumner, C. M. Henneke, *Protein engineering* **1995**, *8*, 13.
- [70] T. P. Quinn, N. B. Tweedy, R. W. Williams, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91*, 8747.
- [71] Y. Kuroda, *Protein engineering* **1995**, *8*, 97.
- [72] H. Wu, J. W. Lustbader, Y. Liu, R. E. Canfield, W. A. Hendrickson, *Structure* **1994**, *2*, 545.
- [73] C. Ban, B. Ramakrishnan, K. Y. Ling, C. Kung, M. Sundaralingam, *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **1994**, *50*, 50.
- [74] C. J. McKnight, D. S. Doering, P. T. Matsudaira, P. S. Kim, *Journal of Molecular Biology* **1996**, *260*, 126.
- [75] C. J. McKnight, P. T. Matsudaira, P. S. Kim, *Nat Struct Mol Biol* **1997**, *4*, 180.
- [76] R. Harada, A. Kitao, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2012**, *8*, 290.
- [77] T. Yoda, Y. Sugita, Y. Okamoto, *Biophysical Journal* **2014**, *106*, 672a.
- [78] A. S. Baltzis, N. M. Glykos, *Protein Science* **2016**, *25*, 587.
- [79] F. J. Blanco, M. A. Jimenez, J. Herranz, M. Rico, J. Santoro, J. L. Nieto, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5887.
- [80] J. P. Cox, P. A. Evans, L. C. Packman, D. H. Williams, D. N. Woolfson, *Journal of Molecular Biology* **1993**, *234*, 483.
- [81] A. G. Cochran, N. J. Skelton, M. A. Starovasnik, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 5578.
- [82] L. L. Cline, M. L. Waters, *Biopolymers* **2009**, *92*, 502.
- [83] A. J. Riemen, M. L. Waters, *Biochemistry* **2009**, *48*, 1525.
- [84] J. F. Espinosa, S. H. Gellman, *Angewandte Chemie* **2000**, *112*, 2420.
- [85] C. M. Santiveri, M. A. Jiménez, *Biopolymers* **2010**, *94*, 779.
- [86] S. E. Kiehna, M. L. Waters, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2003**, *12*, 2657.
- [87] T. Blandl, A. G. Cochran, N. J. Skelton, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2003**, *12*, 237.
- [88] A. Schrimpf, D. Brödje, P. Pfefferle, A. Geyer, *PLOS ONE* **2018**, *13*, e0201735.
- [89] J. W. Neidigh, R. M. Fesinmeyer, N. H. Andersen, *Nat Struct Mol Biol* **2002**, *9*, 425.
- [90] J. W. Neidigh, R. M. Fesinmeyer, K. S. Prickett, N. H. Andersen, *Biochemistry* **2001**, *40*, 13188.
- [91] B. Barua, J. C. Lin, V. D. Williams, P. Kummner, J. W. Neidigh, N. H. Andersen, *Protein Eng Des Sel* **2008**, *21*, 171.
- [92] N. Preußke, W. Moormann, K. Bamberg, M. Lipfert, R. Herges, F. D. Sönnichsen, *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 2650.
- [93] L. N. R. Wafer, W. W. Streicher, G. I. Makhatadze, *Proteins* **2010**, *78*, 1376.
- [94] R. Zhou, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 13280.
- [95] L. Nicke, P. Horx, K. Harms, A. Geyer, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 8634.
- [96] M. Scian, J. C. Lin, I. Le Trong, G. I. Makhatadze, R. E. Stenkamp, N. H. Andersen, *PNAS* **2012**, *109*, 12521.
- [97] A. W. McMillan, B. L. Kier, I. Shu, A. Byrne, N. H. Andersen, W. W. Parson, *The journal of physical chemistry. B* **2013**, *117*, 1790.
- [98] A. Byrne, D. V. Williams, B. Barua, S. J. Hagen, B. L. Kier, N. H. Andersen, *Biochemistry* **2014**, *53*, 6011.
- [99] T. K. Chiu, J. Kubelka, R. Herbst-Irmer, W. A. Eaton, J. Hofrichter, D. R. Davies, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 7517.
- [100] M. D. Struthers, R. P. Cheng, B. Imperiali, *Science (New York, N.Y.)* **1996**, *271*, 342.
- [101] M. S. Lee, G. P. Gippert, K. V. Soman, D. A. Case, P. E. Wright, *Science* **1989**, *245*, 635.
- [102] G. Párraga, S. J. Horvath, A. Eisen, W. E. Taylor, L. Hood, E. T. Young, R. E. Klevit, *Science (New York, N.Y.)* **1988**, *241*, 1489.
- [103] M. A. Weiss, K. A. Mason, C. E. Dahl, H. T. Keutmann, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5660.

- [104] M. Elrod-Erickson, M. A. Rould, L. Nekludova, C. O. Pabo, *Structure* **1996**, *4*, 1171.
- [105] M. H. Ali, E. Peisach, K. N. Allen, B. Imperiali, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 12183.
- [106] M. H. Ali, C. M. Taylor, G. Grigoryan, K. N. Allen, B. Imperiali, A. E. Keating, *Structure* **2005**, *13*, 225.
- [107] I. V. Korendovych, W. F. DeGrado, *Quarterly Reviews of Biophysics* **2020**, *53*, e3.
- [108] B. Eckhardt, *Synthetische Dipeptidbausteine zur Stabilisierung der Struktur von Proteinen*. Zugl.: Marburg, Univ., Diss., 2009, Görlich & Weiershäuser, Marburg, **2009**.
- [109] J. Miller, A. D. McLachlan, A. Klug, *The EMBO Journal* **1985**, *4*, 1609.
- [110] R. S. Brown, C. Sander, P. Argos, *FEBS Letters* **1985**, *186*, 271.
- [111] R. G. Brennan, B. W. Matthews, *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 1903.
- [112] J. M. Berg, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, *85*, 99.
- [113] K. Kluska, J. Adamczyk, A. Krężel, *Coordination Chemistry Reviews* **2018**, *367*, 18.
- [114] C. Abbehausen, *Metallomics* **2019**, *11*, 15.
- [115] W. Li, J. Zhang, J. Wang, W. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 892.
- [116] T. Kočańczyk, M. Nowakowski, D. Wojewska, A. Kocyla, A. Ejchart, W. Koźmiński, A. Krężel, *Sci Rep* **2016**, *6*, 36346.
- [117] L. Fairall, D. Rhodes, A. Klug, *Journal of Molecular Biology* **1986**, *192*, 577.
- [118] D. Rhodes, A. Klug, *Cell* **1986**, *46*, 123.
- [119] F. Payre, A. Vincent, *FEBS Letters* **1988**, *234*, 245.
- [120] G. Bulaj, T. Kortemme, D. P. Goldenberg, *Biochemistry* **1998**, *37*, 8965.
- [121] A. T. Maynard, D. G. Covell, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1047.
- [122] J. N. Smith, J. T. Hoffman, Z. Shirin, C. J. Carrano, *Inorganic chemistry* **2005**, *44*, 2012.
- [123] Y.-M. Lee, C. Lim, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8691.
- [124] S. Iuchi, N. Kuldell, *Zinc Finger Proteins. From Atomic Contact to Cellular Function*, Landes Bioscience / Eurekah.com and Kluwer Academic / Plenum Publishers, Boston, MA, **2005**.
- [125] C. A. Blasie, J. M. Berg, *Biochemistry* **2004**, *43*, 10600.
- [126] A. R. Reddi, C. J. Reedy, S. Mui, B. R. Gibney, *Biochemistry* **2007**, *46*, 291.
- [127] A. M. Rich, E. Bombarda, A. D. Schenk, P. E. Lee, E. H. Cox, A. M. Spuches, L. D. Hudson, B. Kieffer, D. E. Wilcox, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10405.
- [128] J. T. Kellis, K. Nyberg, D. Sali, A. R. Fersht, *Nature* **1988**, *333*, 784.
- [129] B. van den Burg, B. W. Dijkstra, G. Vriend, B. van der Vinne, G. Venema, V. G. Eijsink, *European Journal of Biochemistry* **1994**, *220*, 981.
- [130] C. A. Gersbach, T. Gaj, C. F. Barbas, *Accounts of Chemical Research* **2014**, 2309.
- [131] M.-S. Kim, A. G. Kini, *Molecules and cells* **2017**, *40*, 533.
- [132] D. T. Ha, S. Ghosh, C. H. Ahn, D. J. Segal, M.-S. Kim, *The Analyst* **2018**, *143*, 4009.
- [133] S. C. Knight, R. Tjian, J. A. Doudna, *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57*, 4329.
- [134] A. D. Frankel, J. M. Berg, C. O. Pabo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84*, 4841.
- [135] J. M. Berg, D. L. Merkle, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3759.
- [136] T. J. Gibson, J. P. Postma, R. S. Brown, P. Argos, *Protein engineering* **1988**, *2*, 209.
- [137] Y. Nakaseko, D. Neuhaus, A. Klug, D. Rhodes, *Journal of Molecular Biology* **1992**, *228*, 619.
- [138] D. Neuhaus, Y. Nakaseko, J. W.R. Schwabe, A. Klug, *Journal of Molecular Biology* **1992**, *228*, 637.
- [139] R. C. Hoffman, S. J. Horvath, R. E. Klevit, *Protein science : a publication of the Protein Society* **1993**, *2*, 951.
- [140] M. Kochoyan, T. F. Havel, D. T. Nguyen, C. E. Dahl, H. T. Keutmann, M. A. Weiss, *Biochemistry* **1991**, *30*, 3371.
- [141] J. G. Omichinski, G. M. Clore, E. Appella, K. Sakaguchi, A. M. Gronenborn, *Biochemistry* **1990**, *29*, 9324.
- [142] J. H. Laity, B. M. Lee, P. E. Wright, *Current Opinion in Structural Biology* **2001**, *11*, 39.

- [143] S. S. Krishna, I. Majumdar, N. V. Grishin, *Nucleic acids research* **2003**, *31*, 532.
- [144] T. Ravasi, T. Huber, M. Zavolan, A. Forrest, T. Gaasterland, S. Grimmond, D. A. Hume, *Genome Res.* **2003**, *13*, 1430.
- [145] S. K. Swamynathan, *Human Genomics* **2010**, *4*, 263.
- [146] V. A. Narayan, R. W. Kriwacki, J. P. Caradonna, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 7801.
- [147] S. V. Razin, V. V. Borunova, O. G. Maksimenko, O. L. Kantidze, *Biochemistry. Biokhimiia* **2012**, *77*, 217.
- [148] A. A. Fedotova, A. N. Bonchuk, V. A. Mogila, P. G. Georgiev, *Acta naturae* **2017**, *9*, 47.
- [149] H. D. Tadepally, G. Burger, M. Aubry, *BMC Evol Biol* **2008**, *8*, 176.
- [150] B. A. Krizek, B. T. Amann, V. J. Kilfoil, D. L. Merkle, J. M. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4518.
- [151] G. Roesijadi, R. Bogumil, M. Vasák, J. H. Kägi, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 17425.
- [152] O. Sénéque, J.-M. Latour, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17760.
- [153] A. N. Besold, L. R. Widger, F. Namuswe, J. L. Michalek, S. L. J. Michel, D. P. Goldberg, *Mol. BioSyst.* **2016**, *12*, 1183.
- [154] E. E. Meyer, Q. Lin, J. N. Israelachvili, *Langmuir* **2005**, *21*, 256.
- [155] E. E. Meyer, K. J. Rosenberg, J. Israelachvili, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 15739.
- [156] M. J. Lachenmann, J. E. Ladbury, N. B. Phillips, N. Narayana, X. Qian, M. A. Weiss, *Journal of Molecular Biology* **2002**, *316*, 969.
- [157] M. J. Lachenmann, J. E. Ladbury, X. Qian, K. Huang, R. Singh, M. A. Weiss, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2004**, *13*, 3115.
- [158] M. Dhanasekaran, S. Negi, M. Imanishi, M. Suzuki, Y. Sugiura, *Biochemistry* **2008**, *47*, 11717.
- [159] C. A. Kim, J. M. Berg, *Nature structural biology* **1996**, *3*, 940.
- [160] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, *Journal of proteome research* **2006**, *5*, 196.
- [161] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, *Journal of proteome research* **2006**, *5*, 3173.
- [162] D. Keilin, T. Mann, *Biochem J* **1940**, *34*, 1163.
- [163] B. L. Vallee, H. Neurath, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 5006.
- [164] M. Chvapil, *Life Sciences* **1973**, *13*, 1041.
- [165] K. H. Falchuk in *Molecular and cellular effects of nutrition on disease processes* (Hrsg.: G. N. Pierce, T. Izumi, H. Rupp, A. Grynberg), Springer-Verlag New York, [Place of publication not identified], **2013**, S. 41–48.
- [166] J. W. Schwabe, A. Klug, *Nature structural biology* **1994**, *1*, 345.
- [167] G. P. Diakun, L. Fairall, A. Klug, *Nature* **1986**, *324*, 698.
- [168] S. S. Hasnain, E. M. Wardell, C. D. Garner, M. Schlösser, D. Beyersmann, *Biochem J* **1985**, *230*, 625.
- [169] J. Ward, E. Ollmann, E. Maxey, L. A. Finney, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2014**, *1122*, 171.
- [170] B. A. Krizek, J. M. Berg, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 2984.
- [171] G. Párraga, S. Horvath, L. Hood, E. T. Young, R. E. Klevit, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1990**, *87*, 137.
- [172] M. C. Posewitz, D. E. Wilcox, *Chemical Research in Toxicology* **1995**, *8*, 1020.
- [173] V. Sivo, G. D'Abrosca, I. Baglivo, R. Iacovino, P. V. Pedone, R. Fattorusso, L. Russo, G. Malgieri, C. Isernia, *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 1067.
- [174] V. Sivo, G. D'Abrosca, L. Russo, R. Iacovino, P. V. Pedone, R. Fattorusso, C. Isernia, G. Malgieri, *Bioinorganic Chemistry and Applications* **2017**, *2017*, 1527247.
- [175] E. Kopera, T. Schwerdtle, A. Hartwig, W. Bal, *Chemical Research in Toxicology* **2004**, *17*, 1452.
- [176] K. Kluska, J. Adamczyk, A. Krężel, *Metallomics* **2018**, *10*, 248.
- [177] A. L. Guerrerio, J. M. Berg, *Biochemistry* **2004**, *43*, 5437.

- [178] J. K. Nyborg, O. B. Peersen, *Biochemical Journal* **2004**, *381*, e3-4.
- [179] O. Sénèque, E. Bonnet, F. L. Joumas, J.-M. Latour, *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 4798.
- [180] L. B. Poole, *Free radical biology & medicine* **2015**, *80*, 148.
- [181] P. Madzellan, T. Labunska, M. A. Wilson, *The FEBS Journal* **2012**, *279*, 4111.
- [182] H. Nakamura, *Quarterly Reviews of Biophysics* **1996**, *29*, 1.
- [183] M. F. Perutz, *Science (New York, N.Y.)* **1978**, *201*, 1187.
- [184] Y. Nozaki, C. Tanford in *Methods in Enzymology : Enzyme Structure*, Academic Press, **1967**, S. 715–734.
- [185] H.-S. Won, L. Y. Low, R. de Guzman, M. Martinez-Yamout, U. Jakob, H. J. Dyson, *Journal of Molecular Biology* **2004**, *341*, 893.
- [186] S. F. Michael, V. J. Kilfoil, M. H. Schmidt, B. T. Amann, J. M. Berg, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, *89*, 4796.
- [187] T. Miura, T. Satoh, H. Takeuchi, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1998**, *1384*, 171.
- [188] A. Nomura, Y. Sugiura, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 3693.
- [189] A. Vincent, H. V. Colot, M. Rosbash, *Journal of Molecular Biology* **1985**, *186*, 149.
- [190] R. Schuh, W. Aicher, U. Gaul, S. Côte, A. Preiss, D. Maier, E. Seifert, U. Nauber, C. Schröder, R. Kemler et al., *Cell* **1986**, *47*, 1025.
- [191] C. A. Blasie, J. M. Berg, *Biochemistry* **2002**, *41*, 15068.
- [192] M. J. Lachenmann, J. E. Ladbury, J. Dong, K. Huang, P. Carey, M. A. Weiss, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13910.
- [193] Y. Shi, R. D. Beger, J. M. Berg, *Biophysical Journal* **1993**, *64*, 749.
- [194] A. Witkiewicz-Kucharczyk, W. Bal, *Toxicology Letters* **2006**, *162*, 29.
- [195] A. Hartwig, M. Asmuss, I. Ehleben, U. Herzer, D. Kostelac, A. Pelzer, T. Schwerdtle, A. Bürkle, *Environmental health perspectives* **2002**, *110 Suppl 5*, 797.
- [196] S. M. Quintal, Q. A. dePaula, N. P. Farrell, *Metallomics* **2011**, *3*, 121.
- [197] A. Hartwig, L. H. F. Mullenders, M. Asmuß, M. Benters, I. Krüger in *Metals and Genetics* (Hrsg.: B. Sarkar), Springer US, Boston, MA, **1999**, S. 159–169.
- [198] P. F. Predki, B. Sarkar, *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 5842.
- [199] P. F. Predki, B. Sarkar, *Environmental health perspectives* **1994**, *102 Suppl 3*, 195.
- [200] J. M. Ordemann, R. N. Austin, *Metallomics* **2016**, *8*, 579.
- [201] A. Y. Louie, T. J. Meade, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 6663.
- [202] C. F. Shaw III, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2589.
- [203] A. Avan, T. J. Postma, C. Ceresa, A. Avan, G. Cavaletti, E. Giovannetti, G. J. Peters, *The oncologist* **2015**, *20*, 411.
- [204] M. A. Franzman, A. M. Barrios, *Inorganic chemistry* **2008**, *47*, 3928.
- [205] Q. A. de Paula, Q. Liu, E. Almaraz, J. A. Denny, J. B. Mangrum, N. Bhuvanesh, M. Y. Darensbourg, N. P. Farrell, *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* **2009**, 10896.
- [206] Q. A. de Paula, J. B. Mangrum, N. P. Farrell, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2009**, *103*, 1347.
- [207] F. Mendes, M. Groessl, A. A. Nazarov, Y. O. Tsybin, G. Sava, I. Santos, P. J. Dyson, A. Casini, *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 2196.
- [208] M. A. Castiglione Morelli, A. Ostuni, P. L. Cristinziano, D. Tesauro, A. Bavoso, *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2013**, *19*, 227.
- [209] A. Jacques, C. Lebrun, A. Casini, I. Kieffer, O. Proux, J.-M. Latour, O. Sénèque, *Inorganic chemistry* **2015**, *54*, 4104.
- [210] J. M. Pascoe, J. J. Roberts, *Biochemical Pharmacology* **1974**, *23*, 1345.
- [211] P. J. Stone, A. D. Kelman, F. M. Sinex, *Nature* **1974**, *251*, 736.
- [212] S. Yuan, X. Ding, Y. Cui, K. Wei, Y. Zheng, Y. Liu, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017*, 1778.

- [213] S. D. Tsotsoros, P. B. Lutz, A. G. Daniel, E. J. Peterson, R. E. F. de Paiva, E. Rivera, Y. Qu, C. A. Bayse, N. P. Farrell, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1269.
- [214] A. I. Anzellotti, Q. Liu, M. J. Bloemink, J. N. Scarsdale, N. Farrell, *Chemistry & Biology* **2006**, *13*, 539.
- [215] G. Rickey Welch, B. Somogyi, S. Damjanovich, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **1982**, *39*, 109.
- [216] E. Di Cera, *Biophysics Reviews* **2020**, *1*, 11303.
- [217] R. J. Williams, *European Journal of Biochemistry* **1989**, *183*, 479.
- [218] A. Barth, C. Zscherp, *Quarterly Reviews of Biophysics* **2002**, *35*, 369.
- [219] K. H. Lee, D. Xie, E. Freire, L. M. Amzel, *Proteins* **1994**, *20*, 68.
- [220] F. R.N. Gurd, T. M. Rothges in *Advances in Protein Chemistry* (Hrsg.: C. B. Anfinsen, M. L. Anson, J. T. Edsall, F. M. Richards), Academic Press, **1968**, S. 73–165.
- [221] K. Roth, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1982**, *30*, 653.
- [222] G. Wagner, *Current Opinion in Structural Biology* **1993**, *3*, 748.
- [223] C. Dalvit, P. Pevarello, M. Tatò, M. Veronesi, A. Vulpetti, M. Sundström, *J Biomol NMR* **2000**, *18*, 65.
- [224] X. Yao, U. H. N. Dürr, Z. Gattin, Y. Laukat, R. L. Narayanan, A.-K. Brückner, C. Meisinger, A. Lange, S. Becker, M. Zweckstetter, *PloS one* **2014**, *9*, e112374.
- [225] A. G. Palmer, M. Rance, P. E. Wright, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4371.
- [226] G. M. Clore, P. C. Driscoll, P. T. Wingfield, A. M. Gronenborn, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7387.
- [227] A. G. Palmer, R. A. Hochstrasser, D. P. Millar, M. Rance, P. E. Wright, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6333.
- [228] R. Brüschweiler, X. Liao, P. E. Wright, *Science (New York, N.Y.)* **1995**, *268*, 886.
- [229] N. P. Pavletich, C. O. Pabo, *Science (New York, N.Y.)* **1991**, *252*, 809.
- [230] D. S. Wuttke, M. P. Foster, D. A. Case, J. M. Gottesfeld, P. E. Wright, *Journal of Molecular Biology* **1997**, *273*, 183.
- [231] R. T. Nolte, R. M. Conlin, S. C. Harrison, R. S. Brown, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 2938.
- [232] J. A. Gogos, J. Jin, H. Wan, M. Kokkinidis, F. C. Kafatos, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 2159.
- [233] C. O. Pabo, E. Peisach, R. A. Grant, *Annual review of biochemistry* **2001**, *70*, 313.
- [234] S. Iuchi in *Molecular Biology Intelligence Unit* (Hrsg.: S. Iuchi, N. Kuldell), Landes Bioscience / Eurekah.com and Kluwer Academic / Plenum Publishers, Boston, MA, **2005**, S. 7–13.
- [235] K. J. Brayer, D. J. Segal, *Cell biochemistry and biophysics* **2008**, *50*, 111.
- [236] J. M. Matthews, M. Sunde, *IUBMB life* **2002**, *54*, 351.
- [237] A. H. Fox, C. Liew, M. Holmes, K. Kowalski, J. Mackay, M. Crossley, *The EMBO Journal* **1999**, *18*, 2812.
- [238] A. P. Tsang, J. E. Visvader, C.A. Turner, Y. Fujiwara, C. Yu, M. J. Weiss, M. Crossley, S. H. Orkin, *Cell* **1997**, *90*, 109.
- [239] C. K. Liew, K. Kowalski, A. H. Fox, A. Newton, B. K. Sharpe, M. Crossley, J. P. Mackay, *Structure* **2000**, *8*, 1157.
- [240] N. P. Pavletich, C. O. Pabo, *Science (New York, N.Y.)* **1993**, *261*, 1701.
- [241] Y. Koyabu, K. Nakata, K. Mizugishi, J. Aruga, K. Mikoshiba, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 6889.
- [242] A. M. Jetten, *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 3473.
- [243] A. J. Timmis, N. A. Riobo-Del Galdo, *Biochem J* **2020**, *477*, 4343.
- [244] M. J. Thomas, E. Seto, *Gene* **1999**, *236*, 197.
- [245] Y. Shi, J.-S. Lee, K. M. Galvin, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1997**, *1332*, F49-F66.
- [246] Y. Shi, E. Seto, L.-S. Chang, T. Shenk, *Cell* **1991**, *67*, 377.
- [247] N. Hariharan, D. E. Kelley, R. P. Perry, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, *88*, 9799.

- [248] M. E. Donohoe, X. Zhang, L. McGinnis, J. Biggers, E. Li, Y. Shi, *Molecular and cellular biology* **1999**, *19*, 7237.
- [249] G. Pisaneschi, S. Ceccotti, M. L. Falchetti, S. Fiumicino, F. Carnevali, E. Beccari, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1994**, *205*, 1236.
- [250] H. B. Houbaviy, A. Usheva, T. Shenk, S. K. Burley, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 13577.
- [251] Y. L. Yao, W. M. Yang, E. Seto, *Molecular and cellular biology* **2001**, *21*, 5979.
- [252] M. Austen, B. Lüscher, J. M. Lüscher-Firzlauff, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 1709.
- [253] H. Liu, Y. Shi in *Molecular Biology Intelligence Unit* (Hrsg.: S. Iuchi, N. Kuldell), Landes Bioscience / Eureka.com and Kluwer Academic / Plenum Publishers, Boston, MA, **2005**, S. 182–194.
- [254] S. Bushmeyer, K. Park, M. L. Atchison, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 30213.
- [255] J. S. Lee, R. H. See, K. M. Galvin, J. Wang, Y. Shi, *Nucleic Acids Res* **1995**, *23*, 925.
- [256] K. G. Becker, P. Jedlicka, N. S. Templeton, L. Liotta, O. Keiko, *Gene* **1994**, *150*, 259.
- [257] K. A. Eliassen, A. Baldwin, E. M. Sikorski, M. M. Hurt, *Molecular and cellular biology* **1998**, *18*, 7106.
- [258] M. Hiromura, C. H. Choi, N. A. Sabourin, H. Jones, D. Bachvarov, A. Usheva, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 14046.
- [259] P. J. Robinson, N. J. Bulleid, *Cells* **2020**, *9*.
- [260] K. A. Webster, H. Prentice, N. H. Bishopric, *Antioxidants & redox signaling* **2001**, *3*, 535.
- [261] L. Randall, *Trends in biochemical sciences* **1995**, *20*, 65.
- [262] T. Gidalevitz, F. Stevens, Y. Argon, *Biochimica et biophysica acta* **2013**, *1833*, 2410.
- [263] J. M. Thornton, *Journal of Molecular Biology* **1981**, *151*, 261.
- [264] M. T. Petersen, P. H. Jonson, S. B. Petersen, *Protein engineering* **1999**, *12*, 535.
- [265] W. Qian, S. Krimm, *Peptide Science* **1993**, *33*, 1591.
- [266] P. J. Halling, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **1995**, *62*, 105.
- [267] L. J. Perry, R. Wetzel, *Science (New York, N.Y.)* **1984**, *226*, 555.
- [268] W. A. Baase, L. Liu, D. E. Tronrud, B. W. Matthews, *Protein Science* **2010**, *19*, 631.
- [269] M. Matsumura, W. J. Becktel, M. Levitt, B. W. Matthews, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, *86*, 6562.
- [270] D. B. Craig, A. A. Dombkowski, *BMC Bioinformatics* **2013**, *14*, 346.
- [271] P. E. Pjura, M. Matsumura, J. A. Wozniak, B. W. Matthews, *Biochemistry* **1990**, *29*, 2592.
- [272] A. G. Cochran, R. T. Tong, M. A. Starovasnik, E. J. Park, R. S. McDowell, J. E. Theaker, N. J. Skelton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 625.
- [273] S. J. Russell, T. Blandl, N. J. Skelton, A. G. Cochran, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 388.
- [274] G. A. Schellekens, H. Visser, B. A. W. de Jong, F. H. J. van den Hoogen, J. M. W. Hazes, F. C. Breedveld, W. J. van Venrooij, *Arthritis and rheumatism* **2000**, *43*, 155.
- [275] A. Schrimpf, U. Linne, A. Geyer, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2512.
- [276] H. W. Schroeder, L. Cavacini, *The Journal of allergy and clinical immunology* **2010**, *125*, S41-52.
- [277] J. B. Adlersberg, *La Ricerca in clinica e in laboratorio* **1976**, *6*, 191.
- [278] H. Liu, K. May, *mAbs* **2012**, *4*, 17.
- [279] S. Angal, D. J. King, M. W. Bodmer, A. Turner, A.D.G. Lawson, G. Roberts, B. Pedley, J. R. Adair, *Molecular immunology* **1993**, *30*, 105.
- [280] J. W. Bloom, M. S. Madanat, D. Marriott, T. Wong, S. Y. Chan, *Protein science : a publication of the Protein Society* **1997**, *6*, 407.
- [281] H. Kessler, S. Mronga, G. Müller, L. Moroder, R. Huber, *Biopolymers* **1991**, *31*, 1189.
- [282] L. Moroder, G. Hübener, S. Göhring-Romani, W. Göhring, H.-J. Musiol, E. Wünsch, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 3305.
- [283] L. Moroder, H.-J. Musiol, M. Götz, C. Renner, *Biopolymers* **2005**, *80*, 85.
- [284] L. J. Harris, E. Skaletsky, A. McPherson, *Journal of Molecular Biology* **1998**, *275*, 861.

- [285] H. Kessler, *Angewandte Chemie International Edition* **1982**, *21*, 512.
- [286] Jeremy M Berg, John L Tymoczko, Lubert Stryer in *Biochemistry. 5th edition* (Hrsg.: J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer), W H Freeman, **2002**.
- [287] K. Wüthrich, *Angewandte Chemie* **2003**, *115*, 3462.
- [288] K. Wüthrich, *NMR of proteins and nucleic acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [289] D. Marion, *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2013**, *12*, 3006.
- [290] F. A. L. Anet, A. J. R. Bourn, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5250.
- [291] W. Braun, M. Vasák, A. H. Robbins, C. D. Stout, G. Wagner, J. H. Kägi, K. Wüthrich, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, *89*, 10124.
- [292] P. Schultze, E. Wörgötter, W. Braun, G. Wagner, M. Vašák, J. H.R. Kägi, K. Wüthrich, *Journal of Molecular Biology* **1988**, *203*, 251.
- [293] A. H. Robbins, D. E. McRee, M. Williamson, S. A. Collett, N. H. Xuong, W. F. Furey, B. C. Wang, C. D. Stout, *Journal of Molecular Biology* **1991**, *221*, 1269.
- [294] W. F. Furey, A. H. Robbins, L. L. Clancy, D. R. Winge, B. C. Wang, C. D. Stout, *Science (New York, N.Y.)* **1986**, *231*, 704.
- [295] M. P. Williamson, T. F. Havel, K. Wüthrich, *Journal of Molecular Biology* **1985**, *182*, 295.
- [296] A. D. Kline, W. Braun, K. Wüthrich, *Journal of Molecular Biology* **1988**, *204*, 675.
- [297] M. Billeter, A. D. Kline, W. Braun, R. Huber, K. Wüthrich, *Journal of Molecular Biology* **1989**, *206*, 677.
- [298] M. Bolognesi, G. Gatti, E. Menegatti, M. Guarneri, M. Marquart, E. Papamokos, R. Huber, *Journal of Molecular Biology* **1982**, *162*, 839.
- [299] Y. Hamuro, S. J. Coales, M. R. Southern, J. F. Nemeth-Cawley, D. D. Stranz, P. R. Griffin, *Journal of Biomolecular Techniques : JBT* **2003**, *14*, 171.
- [300] R. T. McKay in *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, v.66 (Hrsg.: G. A. Webb), Elsevier textbooks, s.l., **2009**, S. 33–76.
- [301] M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenár, *Journal of biomolecular NMR* **1992**, *2*, 661.
- [302] V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik, V. Saudek, *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **1993**, *102*, 241.
- [303] R. Freeman, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1397.
- [304] S. Grzesiek, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12593.
- [305] A. F. Angyán, B. Szappanos, A. Perczel, Z. Gáspári, *BMC Structural Biology* **2010**, *10*, 39.
- [306] M. Karplus, J. A. McCammon, *Nature structural biology* **2002**, *9*, 646.
- [307] W. Berhanu, P. Jiang, U. H. E. Hansmann in *Springer Series in Bio- / Neuroinformatics*, v.1 (Hrsg.: A. Liwo), Springer, Dordrecht, **2012**, S. 249–267.
- [308] I. Newton, *The system of the world*, 7. Aufl., University of California Press, Berkeley, Calif., **1973**.
- [309] R. W. Benz, F. Castro-Román, D. J. Tobias, S. H. White, *Biophysical Journal* **2005**, *88*, 805.
- [310] T. Hansson, C. Oostenbrink, W. van Gunsteren, *Current Opinion in Structural Biology* **2002**, *12*, 190.
- [311] D. A. Case, *Accounts of Chemical Research* **2002**, *35*, 325.
- [312] E. Krieger, T. Darden, S. B. Nabuurs, A. Finkelstein, G. Vriend, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2004**, *57*, 678.
- [313] M. Feig, G. Nawrocki, I. Yu, P.-h. Wang, Y. Sugita, *Journal of physics. Conference series* **2018**, *1036*.
- [314] B. J. Alder, T. E. Wainwright, *The Journal of Chemical Physics* **1957**, *27*, 1208.
- [315] J. A. McCammon, B. R. Gelin, M. Karplus, *Nature* **1977**, *267*, 585.
- [316] M. Levitt, R. Sharon, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, *85*, 7557.
- [317] J. D. WATSON, F. H. CRICK, *Nature* **1953**, *171*, 737.
- [318] V. Daggett, M. Levitt, *Journal of Molecular Biology* **1992**, *223*, 1121.

- [319] M. Karplus, J. Kuriyan, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 6679.
- [320] L. V. Bock, C. Blau, G. F. Schröder, I. I. Davydov, N. Fischer, H. Stark, M. V. Rodnina, A. C. Vaiana, H. Grubmüller, *Nat Struct Mol Biol* **2013**, *20*, 1390.
- [321] M. Levitt, A. Warshel, *Nature* **1975**, *253*, 694.
- [322] S. A. Hollingsworth, R. O. Dror, *Neuron* **2018**, *99*, 1129.
- [323] G. E. Moore, *IEEE Solid-State Circuits Soc. Newsl.* **2006**, *11*, 33.
- [324] R. Salomon-Ferrer, A. W. Götz, D. Poole, S. Le Grand, R. C. Walker, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2013**, *9*, 3878.
- [325] J. E. Stone, M. J. Hallock, J. C. Phillips, J. R. Peterson, Z. Luthey-Schulten, K. Schulten in *2016 IEEE International Parallel and Distributed Processing Symposium Workshops (IPDPSW)*, **2016**, S. 89–100.
- [326] D. E. Shaw, M. M. Deneroff, R. O. Dror, J. S. Kuskin, R. H. Larson, J. K. Salmon, C. Young, B. Batson, K. J. Bowers, J. C. Chao et al., *Commun. ACM* **2008**, *51*, 91.
- [327] K. Lindorff-Larsen, P. Maragakis, S. Piana, D. E. Shaw, *The journal of physical chemistry. B* **2016**, *120*, 8313.
- [328] M. Shirts, V. S. Pande, *Science (New York, N.Y.)* **2000**, *290*, 1903.
- [329] M. I. Zimmerman, J. R. Porter, M. D. Ward, S. Singh, N. Vithani, A. Meller, U. L. Mallimadugula, C. E. Kuhn, J. H. Borowsky, R. P. Wiewiora et al., *bioRxiv : the preprint server for biology* **2020**.
- [330] H.J.C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, *Computer Physics Communications* **1995**, *91*, 43.
- [331] M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, *SoftwareX* **2015**, *1-2*, 19.
- [332] B. R. Brooks, C. L. Brooks, A. D. Mackerell, L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch et al., *Journal of Computational Chemistry* **2009**, *30*, 1545.
- [333] D. A. Case, T. E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, R. J. Woods, *Journal of Computational Chemistry* **2005**, *26*, 1668.
- [334] J. C. Phillips, D. J. Hardy, J. D. C. Maia, J. E. Stone, J. V. Ribeiro, R. C. Bernardi, R. Buch, G. Fiorin, J. Héning, W. Jiang et al., *The Journal of Chemical Physics* **2020**, *153*, 44130.
- [335] R. Anandakrishnan, A. Drozdetski, R. C. Walker, A. V. Onufriev, *Biophysical Journal* **2015**, *108*, 1153.
- [336] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *The Journal of Chemical Physics* **1983**, *79*, 926.
- [337] M. F. Harrach, B. Drossel, *The Journal of Chemical Physics* **2014**, *140*, 174501.
- [338] P. E. M. Lopes, O. Guvench, A. D. MacKerell, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2015**, *1215*, 47.
- [339] J. W. Ponder, D. A. Case, World Scientific Publishing, **1993**, S. 27–85.
- [340] J. D. Waals, *Over de continuïteit van den gas- en vloeïstoestand*, A. W. Sijthoff, **1873**.
- [341] P. G. Huray, *Maxwell's equations*, Wiley IEEE Press; IEEE Xplore, Hoboken, New Jersey, Piscataway, New Jersey, **2011**.
- [342] A. D. MacKerell, M. Feig, C. L. Brooks, *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1400.
- [343] A. D. MacKerell, M. Feig, C. L. Brooks, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 698.
- [344] J. Mittal, R. B. Best, *Biophysical Journal* **2010**, *99*, L26-8.
- [345] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179.
- [346] J. Huang, S. Rauscher, G. Nawrocki, T. Ran, M. Feig, B. L. de Groot, H. Grubmüller, A. D. MacKerell, *Nature methods* **2017**, *14*, 71.
- [347] C. Tian, K. Kasavajhala, K. A. A. Belfon, L. Raguette, H. Huang, A. N. Migués, J. Bickel, Y. Wang, J. Pincay, Q. Wu et al., *Journal of Chemical Theory and Computation* **2020**, *16*, 528.
- [348] M. J. Robertson, J. Tirado-Rives, W. L. Jorgensen, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2015**, *11*, 3499.

- [349] Z. Lin, W. F. van Gunsteren, *Journal of Computational Chemistry* **2013**, *34*, 2796.
- [350] P. Robustelli, S. Piana, D. E. Shaw, *PNAS* **2018**, *115*, E4758-E4766.
- [351] E. Braun, J. Gilmer, H. B. Mayes, D. L. Mobley, J. I. Monroe, S. Prasad, D. M. Zuckerman, *Living journal of computational molecular science* **2019**, *1*.
- [352] M. Kouza, A. Kolinski, I. A. Buhimschi, A. Kloczkowski in *Springer Series on Bio- and Neurosystems* (Hrsg.: A. Liwo), Springer International Publishing; Imprint: Springer, Cham, **2019**, S. 541–558.
- [353] J. Farmer, F. Kanwal, N. Nikulsin, M. C. B. Tsilimigras, D. J. Jacobs, *Entropy (Basel, Switzerland)* **2017**, *19*.
- [354] M. B. Kubitzki, B. L. de Groot, *Biophysical Journal* **2007**, *92*, 4262.
- [355] C. Moreira, A. R. Calixto, J. P. Richard, S. C. L. Kamerlin, *Biochemical Society Transactions* **2019**, *47*, 1449.
- [356] J. B. Brokaw, J.-W. Chu, *Biophysical Journal* **2010**, *99*, 3420.
- [357] H. Grubmüller, B. Heymann, P. Tavan, *Science (New York, N.Y.)* **1996**, *271*, 997.
- [358] D. Hamelberg, J. Mongan, J. A. McCammon, *The Journal of Chemical Physics* **2004**, *120*, 11919.
- [359] Y. Sugita, Y. Okamoto, *Chemical Physics Letters* **1999**, *314*, 141.
- [360] A. Laio, M. Parrinello, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 12562.
- [361] R. O. Dror, M. Ø. Jensen, D. W. Borhani, D. E. Shaw, *J Gen Physiol* **2010**, *135*, 555.
- [362] G. G. Maisuradze, A. Liwo, P. Senet, H. A. Scheraga, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2013**, *9*, 2907.
- [363] A. Hospital, J. R. Goñi, M. Orozco, J. L. Gelpí, *Advances and applications in bioinformatics and chemistry : AABC* **2015**, *8*, 37.
- [364] I. Liepuoniute, J. N. Sanders, M. A. Garcia-Garibay, K. N. Houk, *The Journal of Organic Chemistry* **2020**, *85*, 8695.
- [365] S. Izrailev, S. Stepaniants, B. Isralewitz, D. Kosztin, H. Lu, F. Molnar, W. Wriggers, K. Schulten in *Lecture Notes in Computational Science and Engineering, Vol. 4* (Hrsg.: P. Deuffhard, J. Hermans, B. Leimkuhler, A. E. Mark, S. Reich, R. D. Skeel), Springer, Berlin, Heidelberg, **1999**, S. 39–65.
- [366] C. Theodoropoulos, Y. H. Qian, I. G. Kevrekidis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 9840.
- [367] I. G. Kevrekidis, C. W. Gear, G. Hummer, *AIChE J.* **2004**, *50*, 1346.
- [368] R. Lazim, D. Suh, S. Choi, *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 6339.
- [369] E. Chow, J. L. Klepeis, C. A. Rendleman, R. O. Dror, D. E. Shaw in *Comprehensive biophysics* (Hrsg.: E. H. Egelman), Elsevier, Amsterdam, **2012**, S. 86–104.
- [370] A. Barducci, M. Bonomi, M. Parrinello, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **2011**, *1*, 826.
- [371] J. McCarty, M. Parrinello, *The Journal of Chemical Physics* **2017**, *147*, 204109.
- [372] Y.-Y. Zhang, H. Niu, G. Piccini, D. Mendels, M. Parrinello, *The Journal of Chemical Physics* **2019**, *150*, 94509.
- [373] G. Bussi, A. Laio, *Nat Rev Phys* **2020**, *2*, 200.
- [374] D. Branduardi, F. L. Gervasio, A. Cavalli, M. Recanatini, M. Parrinello, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9147.
- [375] A. Laio, A. Rodriguez-Forteza, F. L. Gervasio, M. Ceccarelli, M. Parrinello, *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 6714.
- [376] G. Bussi, F. L. Gervasio, A. Laio, M. Parrinello, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13435.
- [377] C. Micheletti, A. Laio, M. Parrinello, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 170601.
- [378] M. Boero, T. Ikeda, E. Ito, K. Terakura, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16798.
- [379] T. Ishikawa, H. Nagara, K. Kusakabe, N. Suzuki, *Physical review letters* **2006**, *96*, 95502.
- [380] A. Barducci, G. Bussi, M. Parrinello, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 20603.

- [381] G. Bussi, A. Laio, P. Tiwary in *Handbook of Materials Modeling. Methods: Theory and Modeling* (Hrsg.: W. Andreoni, S. Yip), Springer International Publishing, Cham, **2020**, S. 1–31.
- [382] A. J. Illott, S. Palucha, P. Hodgkinson, M. R. Wilson, *The journal of physical chemistry. B* **2013**, *117*, 12286.
- [383] F. Sicard, P. Senet, *The Journal of Chemical Physics* **2013**, *138*, 235101.
- [384] J. F. Dama, M. Parrinello, G. A. Voth, *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *112*, 240602.
- [385] S. Haldar, P. Kührová, P. Banáš, V. Spiwok, J. Šponer, P. Hobza, M. Otyepka, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2015**, *11*, 3866.
- [386] A. K. Pathak, T. Bandyopadhyay, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2017**, *19*, 5560.
- [387] C. C. David, D. J. Jacobs in *Springer protocols, Vol. 1084* (Hrsg.: D. R. Livesay), Humana Pr, New York, **2014**, S. 193–226.
- [388] K. Pearson, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1901**, *2*, 559.
- [389] S. A. M. Stein, A. E. Loccisano, S. M. Firestine, J. D. Evanseck in *Annual Reports in Computational Chemistry* (Hrsg.: D. C. Spellmeyer), Elsevier, **2006**, S. 233–261.
- [390] A. Palazoglu, A. GURSOY, Y. ARKUN, B. ERMAN, *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* **2004**, *11*, 1149.
- [391] J. T. Macdonald, A. G. Purkiss, M. A. Smith, P. Evans, J. M. Goodfellow, C. Slingsby, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2005**, *14*, 1282.
- [392] P. W. Pan, R. J. Dickson, H. L. Gordon, S. M. Rothstein, S. Tanaka, *The Journal of Chemical Physics* **2005**, *122*, 34904.
- [393] F. Sittel, A. Jain, G. Stock, *The Journal of Chemical Physics* **2014**, *141*, 14111.
- [394] R. B. Cattell, *Multivariate behavioral research* **1966**, *1*, 245.
- [395] B. G. Schulze, J. D. Evanseck, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6444.
- [396] A. Amadei, A. B. Linssen, H. J. Berendsen, *Proteins* **1993**, *17*, 412.
- [397] L. Piao, Z. Chen, Q. Li, R. Liu, W. Song, R. Kong, S. Chang, *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*.
- [398] A. Schrimpf, *Formstabile Peptid epitope für die personalisierte Diagnostik der rheumatoiden Arthritis*, **2018**.
- [399] L. Orellana, *Front. Mol. Biosci.* **2019**, *6*, 117.
- [400] C. D. Schwieters, J. J. Kuszewski, N. Tjandra, G. Marius Clore, *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2003**, *160*, 65.
- [401] E. G. Stein, L. M. Rice, A. T. Brünger, *Journal of Magnetic Resonance* **1997**, *124*, 154.
- [402] Y. Tian, C. D. Schwieters, S. J. Opella, F. M. Marassi, *J Biomol NMR* **2017**, *67*, 35.
- [403] P. Horx, A. Geyer, *PLOS ONE* **2020**, *15*, e0230962.
- [404] G. Collier, N. A. Vellore, J. A. Yancey, S. J. Stuart, R. A. Latour, *Biointerphases* **2012**, *7*, 24.
- [405] R. M. Brunne, K. D. Berndt, P. Güntert, K. Wüthrich, W. F. van Gunsteren, *Proteins* **1995**, *23*, 49.
- [406] R. Godwin, W. Gmeiner, F. R. Salsbury, *Journal of biomolecular structure & dynamics* **2016**, *34*, 125.
- [407] S. Niebling, E. Danelius, U. Brath, S. Westenhoff, M. Erdélyi, *Peptide Science* **2015**, *104*, 703.
- [408] E. Deplazes, Y. K.-Y. Chin, G. F. King, R. L. Mancera, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2020**, *88*, 485.
- [409] F. R. Salemme, *Nature* **1982**, *299*, 754.
- [410] L. Martínez, *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0119264.
- [411] F. P. Gasparro, N. H. Kolodny, *J. Chem. Educ.* **1977**, *54*, 258.
- [412] P. Tiwary, M. Parrinello, *The journal of physical chemistry. B* **2015**, *119*, 736.
- [413] D. Min, Y. Liu, I. Carbone, W. Yang, *The Journal of Chemical Physics* **2007**, *126*, 194104.
- [414] B. Jourdain, T. Lelièvre, P.-A. Zitt, *Convergence of metadynamics: discussion of the adiabatic hypothesis*, **2019**.

- [415] A. Schrimpf, F. Hempel, A. Li, U. Linne, U. G. Maier, M. T. Reetz, A. Geyer, *Biochemistry* **2018**, *57*, 3658.
- [416] D. W. Banner, M. Kokkinidis, D. Tsernoglou, *Journal of Molecular Biology* **1987**, *196*, 657.
- [417] T. Granier, B. Langlois d'Estaintot, B. Gallois, J.-M. Chevalier, G. Précigoux, P. Santambrogio, P. Arosio, *J Biol Inorg Chem* **2003**, *8*, 105.
- [418] M. Hulko, F. Berndt, M. Gruber, J. U. Linder, V. Truffault, A. Schultz, J. Martin, J. E. Schultz, A. N. Lupas, M. Coles, *Cell* **2006**, *126*, 929.
- [419] L. Zhu, P. G. Bolhuis, J. Vreede, *PLOS Computational Biology* **2013**, *9*, e1002913.
- [420] R.-M. Lu, Y.-C. Hwang, I.-J. Liu, C.-C. Lee, H.-Z. Tsai, H.-J. Li, H.-C. Wu, *J Biomed Sci* **2020**, *27*, 1.
- [421] R. C. Bernardi, M. C. R. Melo, K. Schulten, *Biochimica et biophysica acta* **2015**, *1850*, 872.
- [422] A. Miseta, P. Csutora, *Mol Biol Evol* **2000**, *17*, 1232.
- [423] L. Columbus, W. L. Hubbell, *Trends in biochemical sciences* **2002**, *27*, 288.
- [424] O. N. Yogurteu, S. B. Erdemli, R. Nussinov, M. Turkay, O. Keskin, *Biophysical Journal* **2008**, *94*, 3475.
- [425] R. J. Mortishire-Smith, M. S. Lee, L. Bolinger, P. E. Wright, *FEBS Letters* **1992**, *296*, 11.
- [426] A. Jasanoff, M. A. Weiss, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1423.
- [427] C. M. Lombardo, V. Kumar M V, C. Douat, F. Rosu, J.-L. Mergny, G. F. Salgado, G. Guichard, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 2516.
- [428] J. H. Viles, S. U. Patel, J. B. Mitchell, C. M. Moody, D. E. Justice, J. Uppenbrink, P. M. Doyle, C. J. Harris, P. J. Sadler, J. M. Thornton, *Journal of Molecular Biology* **1998**, *279*, 973.
- [429] P. Horx, *beta -turn Mimetika in Zinkfingerproteinen Synthese, NMR und Modeling*, Philipps-Universität Marburg, **2016**.
- [430] J. Warwicker, S. Charonis, R. A. Curtis, *Molecular Pharmaceutics* **2014**, *11*, 294.
- [431] J. I. Austerberry, A. Thistlethwaite, K. Fisher, A. P. Golovanov, A. Pluen, R. Esfandiary, C. F. van der Walle, J. Warwicker, J. P. Derrick, R. Curtis, *Biochemistry* **2019**, *58*, 3413.
- [432] C. Priem, A. Wuttke, M. Berditsch, A. S. Ulrich, A. Geyer, *The Journal of Organic Chemistry* **2017**, *82*, 12366.
- [433] S. Jo, T. Kim, V. G. Iyer, W. Im, *Journal of Computational Chemistry* **2008**, *29*, 1859.
- [434] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov et al., *Journal of Computational Chemistry* **2010**, *31*, 671.
- [435] G. Wagner, A. DeMarco, K. Wüthrich, *Biophys. Struct. Mechanism* **1976**, *2*, 139.
- [436] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, K. Palmo, P. Maragakis, J. L. Klepeis, R. O. Dror, D. E. Shaw, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2010**, *78*, 1950.
- [437] L.-P. Wang, K. A. McKiernan, J. Gomes, K. A. Beauchamp, T. Head-Gordon, J. E. Rice, W. C. Swope, T. J. Martínez, V. S. Pande, *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 4023.
- [438] A. W. Sousa da Silva, W. F. Vranken, *BMC Res Notes* **2012**, *5*, 367.
- [439] D. A. Case, *Journal of biomolecular NMR* **1995**, *6*, 341.
- [440] J. Wong-ekkabut, M. Karttunen, *Biochimica et biophysica acta* **2016**, *1858*, 2529.
- [441] G. A. Tribello, M. Bonomi, D. Branduardi, C. Camilloni, G. Bussi, *Computer Physics Communications* **2014**, *185*, 604.
- [442] J.-h. Peng, W. Wang, Y.-q. Yu, H.-l. Gu, X. Huang, *Chinese Journal of Chemical Physics* **2018**, *31*, 404.
- [443] A. Karshikoff, L. Nilsson, R. Ladenstein, *The FEBS Journal* **2015**, *282*, 3899.
- [444] X. Qian, M. A. Weiss, *Biochemistry* **1992**, *31*, 7463.
- [445] M. Hatayama, J. Aruga, *BMC Evol Biol* **2010**, *10*, 53.
- [446] K. Merkens, F. J. Aguilar Troyano, J. Djossou, A. Gómez - Suárez, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 2354.
- [447] V. A. Larionov, N. V. Stoletova, V. I. Kovalev, A. F. Smol'yakov, T.y. F. Savel'yeva, V. I. Maleev, *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 1094.
- [448] R. Saladino, G. Botta, M. Crucianelli, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2012**, *12*, 277.

- [449] E. Danelius, H. Andersson, P. Jarvoll, K. Lood, J. Gräfenstein, M. Erdélyi, *Biochemistry* **2017**, *56*, 3265.
- [450] S. S. Batsanov, *Inorganic Materials* **2001**, *37*, 871.
- [451] A. H. Harkiss, A. Sutherland, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 8911.
- [452] A. O. King, N. Okukado, E.-i. Negishi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 683.
- [453] A. J. Ross, H. L. Lang, R. F. W. Jackson, *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 245.
- [454] N. Atmuri, *Org. Synth.* **2015**, *92*, 103.
- [455] T. Mukaiyama, *Angewandte Chemie* **1976**, *88*, 111.
- [456] H. H. HODGSON, *Chem. Rev.* **1947**, *40*, 251.
- [457] J. Rodríguez, J. Mosquera, O. Vázquez, M. E. Vázquez, J. L. Mascareñas, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 2258.
- [458] R. J. Abraham, M. Canton, M. Reid, L. Griffiths, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, 803.
- [459] H. Friebolin, C. M. Thiele, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Eine Einführung*, 5. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.
- [460] A. E. Torda, R. M. Scheek, W. F. van Gunsteren, *Chemical Physics Letters* **1989**, *157*, 289.
- [461] D. A. Pearlman, P. A. Kollman, *Journal of Molecular Biology* **1991**, *220*, 457.
- [462] M. S. Newman, *J. Chem. Educ.* **1955**, *32*, 344.
- [463] S. Oka, *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* **1980**, *74*, 163.
- [464] N. Sitaram, *Current medicinal chemistry* **2006**, *13*, 679.
- [465] K. D. Morgan, R. J. Andersen, K. S. Ryan, *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36*, 1628.
- [466] O. Ries, M. Büschleb, M. Granitzka, D. Stalke, C. Ducho, *Beilstein journal of organic chemistry* **2014**, *10*, 1135.
- [467] C. Najera, J. M. Sansano, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4584.
- [468] J. He, S. Li, Y. Deng, H. Fu, B. N. Laforteza, J. E. Spangler, A. Homs, J.-Q. Yu, *Science* **2014**, *343*, 1216.
- [469] B. V. S. Reddy, L. R. Reddy, E. J. Corey, *Organic letters* **2006**, *8*, 3391.
- [470] B. Wang, W. A. Nack, G. He, S.-Y. Zhang, G. Chen, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3952.
- [471] K. Chen, S.-Q. Zhang, J.-W. Xu, F. Hu, B.-F. Shi, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13924.
- [472] R. S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog, *Angewandte Chemie* **1966**, *78*, 413.
- [473] L. Nicke, *Die Synthese von β,β -Diaryl- α -Aminosäurehybriden zur Modifikation von Peptidhormonen*, **2020**.
- [474] X. Jiang, S. Yang, M. J. Jellen, K. N. Houk, M. Garcia-Garibay, *Organic letters* **2020**, *22*, 4049.
- [475] V. Z. Spassov, L. Yan, P. K. Flook, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2007**, *16*, 494.
- [476] S. G. Kalko, E. Guàrdia, J. A. Padró, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3935.
- [477] A. G. Anderson, J. Hermans, *Proteins* **1988**, *3*, 262.
- [478] H. S. Biswal, Y. Loquais, B. Tardivel, E. Gloaguen, M. Mons, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3931.
- [479] R. Vargas, J. Garza, B. P. Hay, D. A. Dixon, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 3213.
- [480] a) N. Yoshikawa, G. R. Hutchison, *J Cheminform* **2019**, *11*, 49; b) J. L. Knight, J. D. Yesselman, C. L. Brooks, *Journal of Computational Chemistry* **2013**, *34*, 893.
- [481] R. O. Jones, *Rev. Mod. Phys.* **2015**, *87*, 897.
- [482] A. D. Becke, *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 5648.
- [483] N. Mardirossian, M. Head-Gordon, *Molecular Physics* **2017**, *115*, 2315.
- [484] M. J. Vainio, M. S. Johnson, *Journal of Chemical Information and Modeling* **2007**, *47*, 2462.
- [485] F. Weigend, R. Ahlrichs, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2005**, *7*, 3297.
- [486] J.-J. Hu, P.-Y. He, Y.-M. Li, *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2021**, *27*, e3286.
- [487] C. C. Cabalteja, D. S. Mihalko, W. S. Horne, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 103.
- [488] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen, *Journal of Computational Chemistry* **2005**, *26*, 1701.

- [489] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, J. G. E. M. Fraaije, *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463.
- [490] T. Darden, D. York, L. Pedersen, *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 10089.
- [491] V. Pace, W. Holzer, G. Meng, S. Shi, R. Lalancette, R. Szostak, M. Szostak, *Chemistry – A European Journal* **2016**, *22*, 14494.
- [492] Y. Liu, S. Shi, M. Achtenhagen, R. Liu, M. Szostak, *Organic letters* **2017**, *19*, 1614.
- [493] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji et al., *Gaussian 09 Rev. C.01*, Wallingford, CT, **2009**.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| A | Adenin |
| AcOH | Essigsäure |
| ACPYPE | <i>antechamber python parser interface</i> |
| AMBER | <i>assisted model building with energy refinement</i> |
| B3LYP | Becke, 3-Parameter, Lee-Yang-Parr |
| ber.: | berechnet |
| Boc | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl |
| BPTI | <i>bovine pancreas trypsin inhibitor</i> |
| brine | gesättigte Natriumchloridlösung |
| BTD | β - <i>turn</i> -Dipeptid |
| C | Im Kontext von RNA/DNA: Cytosin |
| CCHH | Cystein-Cystein-Histidin-Histidin-Zinkfingermotiv |
| CD | Circulardichroismus |
| CHARMM | <i>chemistry at harvard macromolecular mechanics</i> |
| CTC | 2-Chlortritylchlorid |
| CV | <i>collective variable</i> |
| Cys | Cystein |
| d | Dublett |
| DC | Dünnschichtchromatografie |
| DCM | Dichlormethan |
| dd | Dublett vom Dublett |
| ddd | Dublett vom Dublett vom Dublett |
| DEE | Diethylether |
| DIPEA | Diisopropylethylamin |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DODT | 2,2'-Ethylendioxydiethanthiol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| EtOAc | Essigsäureethylester |
| EXAFS | <i>extended X-ray absorption fine structure</i> |

| | |
|------------------------------------|---|
| FES | <i>free energy surface</i> |
| Fmoc | Fluorenylmethyloxycarbonyl |
| Fmoc-OSu | <i>N</i> -(Fluorenyl-9-methoxycarbonyloxy)-succinimid |
| G | Guanin |
| gef.: | gefunden |
| GROMACS | <i> groningen machine for chemical simulations</i> |
| His | Histidin |
| Hot=Tap | Hydroxythreonin-Thiaproline |
| HRMS | <i>high resolution mass spectrometry</i> |
| HSQC | <i>heteronuclear single quantum coherence</i> |
| Hz | Hertz |
| IBX | 2-Iodoxybenzoesäure |
| IgG | Immunglobulin der Klasse G |
| IMS | Ionenmobilitätsspektrometrie |
| IR | Infrarotspektroskopie |
| nJ | skalare Kopplung über n Bindungen |
| MeOH | Methanol |
| MD | Moleküldynamik |
| NAMD | <i>nanoscale molecular dynamics</i> |
| NMR | <i>nuclear magnetic resonance</i> |
| NOE | <i>nuclear OVERHAUSER effect</i> |
| NOESY | <i>nuclear OVERHAUSER enhancement spectroscopy</i> |
| OMe | Methoxy |
| OPLS | <i>optimized potentials for liquid simulations</i> |
| PBC | <i>periodic boundary conditions</i> |
| Pbf | 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl |
| PC | <i>principal component</i> |
| PCA | <i>principal component analysis</i> |
| Pd(dba) ₂ | Palladium(0)-bis(dibenzylidenaceton) |
| Pd ₂ (dba) ₃ | Tris-(dibenzylidenaceton)-dipalladium(0) |
| PDB | Protein-Datenbank rcsb.org |
| Rf | Retentionsfaktor |
| RMSD | <i>root-mean-squared deviation</i> |

| | |
|-----------|---|
| RMSF | <i>root-mean-squared fluctuation</i> |
| rp-HPLC | <i>reversed phase high performance liquid chromatography</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Singulett |
| Ser | Serin |
| SPhos | 2-Dicyclohexylphosphino-2',6'-dimethoxybiphenyl |
| SPPS | <i>solid phase peptide synthesis</i> |
| SPV | Scharnier-Peptid-Variante |
| t | Triplet |
| T | Thymin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TFIIIA | <i>transcription factor IIIA</i> |
| TIPS | Triisopropylsilan |
| TOCSY | <i>total correlation spectroscopy</i> |
| TZVP | <i>valence triple-zeta polarization</i> |
| UV/Vis | <i>ultraviolet/visible light spectroscopy</i> |
| vt-NMR | <i>variable-temperature nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> |
| WATERGATE | <i>water suppression by gradient tailored excitation</i> |
| wt-MetaD | <i>well-tempered-Metadynamik</i> |
| ZFV | Zinkfingervariante |

Danksagung

Abschließend möchte ich die nächsten Zeilen den Personen widmen, die mich während meiner Promotion begleitet haben.

I thank Prof. Dr. OLALLA VÁZQUEZ for being the second reviewer of my thesis. Furthermore, I want to thank her for the great time I had in her lab and providing me with resources regarding zinc finger peptides.

Prof. Dr. PETER KOLB danke ich für seine Bereitschaft der Prüfungskommission anzugehören.

Den analytischen Abteilungen, NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie des Fachbereichs Chemie danke ich für die Bearbeitung der unzähligen Proben, die sich im Laufe der Jahre angesammelt haben. Hierbei möchte ich mich besonders bei Frau Dr. XIULAN XIE für die zuverlässige Arbeit, die Erstellung von Pulsprogrammen und die Fortbildung zur Selbstmessung bedanken.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Rechenzentrums (HRZ) für den Zugang zum Rechencluster MaRC2 sowie Beantwortung sämtlicher Fragen im Bereich des *high performance computings*.

Prof. Dr. PAULTHEO VON ZEZSCHWITZ danke ich für die Möglichkeit die Mikrowelle in seinem Arbeitskreis für die Synthese von Hot=Tap zu verwenden.

Der Chefin, SUSANNE SCHELLENBERG danke ich für das Lösung von sämtlichen organisatorischen Problemen, die in der Zeit der Promotion aufgekommen sind. Ohne deine Struktur sähe der Arbeitskreis ganz anders aus.

Ein besonderer Dank gilt meinen Vertiefungs- und Bachelorstudenten PASCAL DEHLER, MAX KEIß, JULIA LUTZ, VALESKA VIERECKT, YUANHAO XIE, TIMO ZIMMER und für ihre Mitarbeit an und Motivation bei den verschiedenen Forschungsprojekten.

Sämtlichen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern des Arbeitskreis GEYER sei für die spannende Zeit im und außerhalb des Labors (Kanutour, Kartfahren, Grillabende, Weihnachtsfeiern) gedankt.

Den Korrekturlesern dieser Arbeit danke ich für ihre aufgebrachte Zeit und hilfreichen Anmerkungen. Ich weiß, das Thema war teilweise sehr schwer zu verstehen.

Dr. CARSTEN AUDEL danke ich für die gute Organisation der Praktika. Durch diese idealen Rahmenbedingungen konnte man sich als Assistent ausschließlich auf die Betreuung der Studenten konzentrieren und so versuchen Wissen und Techniken zu vermitteln.

FABIAN DAUS, meinem langjährigen Boxenpartner und Meister des Silaffins, danke ich nicht nur für die ganze Zeit, die wir zusammen forschen durften, sondern auch für die zahllosen Gespräche. Mit dir war die Promotion sehr erträglich und gemeinsam haben wir die Qualität der Doktorrandenhüte (meindoktorrandenhut24.de) auf ein neues Level gehoben.

MAXIMILIAM JUNG danke ich für die heitere Stimmung, die du trotz der stressigen Zeit immer verbreitest. Einzig allein die Erwähnung der (Un)pünktlichkeit der Bahn konnte dich so richtig in Rage bringen. Dennoch hattest du immer ein offenes Ohr für mich und die unzähligen Praktikanten, denen du viel Hingabe bei der Betreuung gewidmet hast.

Dr. ROMINA KIRSCHNER danke ich für die vorzügliche Versorgung mit Backwaren in jeglicher Variation. Im nächsten Leben ist dann auch ein Platz in meinem Volleyballkurs an der Uni für dich.

DENNIS MICHAEL KLEE danke ich dafür, dass er seine Box regelmäßig in eine Partyzone verwandelte. Sei es "Hoch die Hände Wochenende!" oder "Feierabend wie das duftet". Von deinen Skills kann sich so mancher DJ noch eine Scheibe abschneiden. Seit den Arbeiten mit Thioamiden besuche ich deine Box wegen der Geruchsbelästigung leider viel zu selten.

Dr. LENNART NICKE danke ich für eine Vielzahl von Dingen. Nicht nur hatten wir nahezu jeden Tag viele Themen rund um die Uni zu diskutieren, sondern deine Arbeiten ermöglichte es mir meinen Simulationshorizont zu erweitern. Ich habe dich als Kollegen immer sehr geschätzt. Zuletzt möchte ich dir noch für die Organisation der fachbereichsinternen Schachturniere danken. In diesem Sinne 1 d4!

Dr. CHRISTOPH PRIEM sei für die sportliche Motivation, die er jeden Tag auf ein neues Maximum gehoben hat gedankt. Ich hoffe, die Berge bringen deinen *pace* nicht zu sehr durcheinander.

Dr. JAN REUTZEL dem musikalischen Bruder von DENNIS MICHAEL KLEE danke ich für die damalige Einführung in den Arbeitskreis. Außerdem war es immer angenehm sich mit dir über Kameras zu unterhalten.

Dr. STEFAN LENZ und Dr. ANDREAS SCHRIMPF meinen ehemaligen Boxennachbarn danke ich für ihren ausgezeichneten Musikgeschmack, der mein Bein das ein oder andere Mal zum Mitwippen brachte. Außerdem danke ich euch für die vielen Gespräche die wir nicht nur über die Uni geführt haben. Bis heute bewundere ich die stoische Art von dir ANDI, mit der du jeglicher Situation oder Person entgegengetreten bist.

ANDRÉ SCHMIEGEL danke ich für die schöne Zeit im Labor und gute Laune, die du trotz der Seitenhiebe einiger Doktorranden stets aufrechterhalten hast. Zudem danke ich dir für deine morgendlichen Begrüßungen in der letzten Zeit, so hatte ich am Ende meiner Promotion wenigstens noch ein bisschen Menschenkontakt.

JAN-LUCA SEIPP und MICHELLE KRÜGER danke ich für ihre Mitarbeit im Labor, sei es das Einkaufen/Bestellen von Chemikalien oder die Durchführung von einzelnen Synthesen.

TIMO ZIMMER danke ich für die spannende Zeit, die ich als dein Betreuer hatte. Ich gratuliere dir zum zweimaligen Vater werden und hoffe, du kannst Promotion und Familie gut vereinbaren. Dennoch denke ich, dass du mehr als einen Seminarvortrag machen musst.

Weiterhin danke ich den *Pigeon Boys*, PATRICK BAUMANN und JOERI PEPELS für die schöne Zeit außerhalb des Labors. Eure immerwährende Freundschaft schaffte einen idealen Ausklang zum Laboralltag. Die Stunden in Discord mit euch bereichern mein Leben und möchte ich nicht mehr missen.

JULIA FINKE danke ich für die schöne Zeit außerhalb der Uni. Zwar haben wir es in den Jahren immer seltener geschafft uns zu sehen, aber ich habe mir fest vorgenommen dich häufiger als nur auf dem Weihnachtsmarkt zu sehen.

Ein weiterer Dank gilt LARA SCHLEIFENBAUM für ihre langjährige Freundschaft. Obwohl wir häufig unterschiedlicher Meinung sind, habe ich unsere Zeit zusammen immer genossen und freue mich auf viele weitere Silvester/Bodensee-Urlaube.

Dr. EMRE BABAOGLU gilt mein Dank für alles rund um den Volleyball. Die Zeit mit dir gemeinsam als Trainer hat mir immer viel Freude bereitet.

In diesem Zuge möchte ich mich auch bei meinen Volleyballmannschaft Herren II und Damen IV bedanken. Egal ob als Trainer oder Spieler, die wöchentlichen Trainingseinheiten haben mich fit gehalten und mir viele Freundschaften beschert.

Der Familie SCHWARZE danke ich für die schöne Zeit, die ich bisher in NRW erleben durfte.

Weiterhin danke ich der Familie SASSE für die schönen Stunden auf Familienfeiern oder im Urlaub. Ich hoffe, dass wir irgendwann mal wieder gemeinsam Skifahren können.

Ein riesiges Dankeschön gilt meiner Familie, THOMAS, SILKE, HEIDEMARIE, HANS-JÜRGEN, JUDY und MARINA, ohne deren bedingungslose Unterstützung ich nicht in der Lage gewesen wäre, diese Promotion durchzuführen. Es ist gut zu wissen, dass ihr immer mit Rat und Tat mir zur Seite steht.

Zuletzt muss ich einer Person einen ganz besonderen Dank aussprechen - KERRIN SCHWARZE. Ich kann nicht in Worte fassen, wie dankbar ich für die gemeinsame Zeit mit dir bin. Du hilfst mir, mich permanent weiterzuentwickeln und so ein besserer Mensch zu werden. Ich danke meinem früheren Ich, damals den Salsa-Kurs belegt zu haben.

Lebenslauf

Diese Seite enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung

Erklärung

Ich, Philip Horx, erkläre, dass eine Promotion noch an keiner anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, versucht wurde.

Ich versichere, dass ich meine vorgelegte Dissertation

"Synthetische und theoretische Methoden zur Bestimmung korrelierter Dynamiken in Miniproteinen"

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe Dritter angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Dritte waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der Dissertation nicht beteiligt; insbesondere habe ich hierfür nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden. Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Marburg/Datum

Philip Horx