

JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT



Dissertation

Biochemische und biophysikalische Untersuchung
der parasitären Cysteinprotease Rhodesain
und deren Inhibition durch
kovalent-reversible Inhibitoren

Zur Erlangung des Grades

“Doktor der Naturwissenschaften”

Im Promotionsfach Chemie

Am Fachbereich 09 Chemie, Pharmazie, Geographie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Patrick Johe

geb. in Mainz

Mainz, 2020

Eingereicht beim Fachbereich 09 Chemie, Pharmazie, Geographie und Geowissenschaften
am:

Dekan: [REDACTED]

1 Berichterstatter: [REDACTED]

2 Berichterstatter: [REDACTED]

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Erklärung der Urheberschaft:

Hiermit versichere ich, Patrick Johe, dass ich die als Dissertation vorgelegte Arbeit mit dem Titel „Biochemische und biophysikalische Untersuchung der parasitären Cysteinprotease Rhodesain und deren Inhibition durch kovalent-reversible Inhibitoren“ selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Materialien) in der Arbeit angegeben habe. Ich habe die als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder wissenschaftliche Prüfung eingereicht und habe weder die Arbeit noch Teile davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Mainz, 06.07.2020

Ort, Datum

.....

Patrick Johe

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Abkürzungen und ihre Bedeutungen.

Abkürzung	Bedeutung
ACF	<i>Autocorrelation function</i>
AEX	<i>Anion exchange chromatography</i>
AJ	<i>Adherens junctions</i>
aMD	<i>Accelerated molecular dynamic simulation</i>
α -MFSS	<i>α-Mating-factor secretion signal</i>
AOX1	Alkohol-Oxidase-Promotor 1
APOL1	Apolipoprotein L1
BBB	<i>Blood brain barrier</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
CathL	Cathepsin L
CD	<i>Circular dichroism</i>
CV	<i>Column volume</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EC	<i>Enzyme Commission</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBE	Fluoreszenzbasierter Enzymassay
<i>F. hepatica</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
HAT	<i>Human African Trypanosomiasis</i>
HBMEC	<i>Human brain microvascular endothelial cell</i>
HIC	<i>Hydrophobic interaction chromatography</i>
HpHbR	Haptoglobin-Haemoglobin-Rezeptor
HpRP	<i>Haptoglobin-related protein</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
IB	<i>Inclusion bodies</i>
IMAC	<i>Immobilized metal affinity chromatography</i>
IP-HPLC	<i>Ion pair-high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -d-thiogalactopyranosid
<i>i</i> SPR	<i>Inverse surface plasmon resonance spectroscopy</i>
ITC	<i>Isothermal titration calorimetry</i>
IVT	<i>In vitro transcription</i>
<i>kin</i> ITC-ETC	<i>Kinetic isothermal titration calorimetry-equilibration time curve</i>
LC-MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
MD	<i>Molecular dynamic</i>

MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i>
MOE	<i>Molecular operating environment</i>
MST	<i>Microscale thermophoresis</i>
Ni-NTA	Ni ²⁺ -Nitrilotriessigsäure
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PAR	<i>Protease activated receptor</i>
PBL	<i>Propeptide binding loop</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Protein data base</i>
PET-FCS	<i>Photoinduced electron transfer-fluorescence correlation spectroscopy</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PLC	Phospholipase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QM/MM	Quantenmechanisch/molekülmechanisch
RMSD	<i>Root-mean-square-deviation</i>
RMSF	<i>Root-mean-square-fluctuation</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SAR	<i>Structure activity relationship</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i>
SELEX	<i>Selective evolution of ligands by exponential enrichment</i>
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
SRA	<i>Serum resistance-associated protein</i>
<i>T. b. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
<i>T. congolense</i>	<i>Trypanosoma congolense</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. dionisii</i>	<i>Trypanosoma dionisii</i>
<i>T. equiperdum</i>	<i>Trypanosoma equiperdum</i>
<i>T. molitor</i>	<i>Tenebrio molitor</i>
<i>T. b. rhodesiense</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
<i>T. vivax</i>	<i>Trypanosoma vivax</i>
T7-RNAP	T7-RNA-Polymerase
TbCathB	<i>Trypanosoma brucei</i> Cathepsin B
TbCathL	<i>Trypanosoma brucei</i> Cathepsin L
TbCathLΔ	<i>Trypanosoma brucei</i> Cathepsin L ohne C-terminale Domäne
TbMLP	<i>Trypanosoma brucei</i> mucolipin like protein
TEV	<i>Tabacco etch virus protease</i>
TJ	<i>Tight junctions</i>
TLF	<i>Trypanosome lytic factor</i>
TROSY	<i>Transverse relaxation optimized spectroscopy</i>
VS	Vinylsulfon
VSG	<i>Variant surface glycoproteins</i>
WT	<i>Wild type</i>
WW	Wechselwirkung

Tabelle 2: Spezielle Abkürzungen von Aminosäuren.

Aminosäure	Abkürzung	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Tabelle 3: Auflistung der Abkürzungen von DNA- und RNA-Basen.

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
ATP	Adenosintriphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
TTP	Thymidintriphosphat
UTP	Uridintriphosphat
NTP	Nukleosidtriphosphat

Tabelle 4: Abkürzungen chemischer Substanzen.

Abkürzung	Bedeutung
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
ACN	Acetonitril
BMM-Medium	<i>Buffered minimal methanol-Medium</i>
BIS-TRIS	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
CaCl ₂	Calciumchlorid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GLT	Glutathion
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFIP	Hexafluoroisopropanol
K ₂ HPO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KTT	Kaliumtetrathionat
LB-Medium	<i>Lysogeny broth-Medium</i>
Li ₂ SO ₄	Lithiumsulfat
Mal-PEG	Maleimid-Polytheyleneglycol
Mg(HCOO) ₂	Magnesiumsulfat
NaAsO ₂ Me ₂	Natriumcacodylat
NaBH ₃ CN	Natriumcyanoborhydrid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOAc	Natriumacetat
Pb(OAc) ₂	Blei(II)-Acetat
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEAA-Puffer	Triethylammoniumacetat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TFE	2,2,2-Trifluoroethanol
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
YP-Medium	<i>Yeast-extract peptone-Medium</i>
Z-Phe-Arg-AMC	<i>Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-arginine-7-amidomethylcoumaryl</i>

Danksagung

[Redacted text block containing the main body of the acknowledgments, consisting of approximately 35 lines of blacked-out text.]

[REDACTED]

Abstract

Johannes Gutenberg-University

Institute of Pharmaceutical and Biomedical Sciences

Biochemical and biophysical investigations of the parasitic cysteine protease rhodesain and its inhibition by covalent-reversible inhibitors

by Patrick Johe

Despite its high mortality rate and the huge number of people at risk, **Human African Trypanosomiasis (HAT)**, also called sleeping sickness, still counts as a neglected tropical disease according to the World Health Organization. HAT is caused by different subspecies of African trypanosomes. These unicellular parasites can be transmitted to a human host during the blood meal of a Tse-Tse-fly. Only six drugs with severe side effects are currently available against HAT for which resistances have already been reported. Therefore, the development of new treatment strategies against HAT is urgent.

A promising cellular target is the **cathepsin L protease (CathL)** of *Trypanosoma brucei rhodesiense* (**TbCathL** or rhodesain). This enzyme is essential for the parasite's survival and is involved in the parasite's pathogenicity, including its ability to cross the blood-brain barrier and to escape the immune system of the host.

Like other lysosomal proteases rhodesain is expressed as an inactive pro-form that requires cleavage of its N-terminal propeptide to yield a catalytically active protease. To elucidate the structural basics of this maturation process and the auto-inhibition of the protease by its propeptide, the structure of pro-rhodesain was first time solved using X-ray crystallography. Intriguingly, the propeptide forms a trypanosome-specific α -helix that blocks the active site and undergoes molecular interactions with the catalytic domain that are reminiscent of the covalent cysteine protease inhibitor K11777. Thereby, the crystal structure provides a rational explanation for the efficacy of this inhibitor.

The pro-rhodesain crystal structure also provided the basis for the investigation of the pH-dependent auto-activation of the rhodesain zymogen through a combination of **molecular dynamic simulations (MD)**, mutagenesis studies and various spectroscopic measurements. To facilitate these investigations a heterologous expression and purification protocol for rhodesain from *E. coli* was established.

In addition, the binding of rhodesain to different (α -fluoro-)vinyl sulfones (**VS**), which inhibit the enzyme in a covalent reversible or irreversible manner, was thermodynamically and kinetically determined using **isothermal titration calorimetry (ITC)** and a **photoinduced electron transfer-fluorescence correlation spectroscopy (PET-FCS)** system.

To inhibit rhodesain, the inhibitors must reach the lysosome of the trypanosome, in which the cysteine protease is located. Therefore, synthesis and analysis options of an organelle-specific drug delivery

system based on VS-RNA aptamer bioconjugates were examined. This approach was inspired by an RNA aptamer that, after binding to the flagellar pocket of *T. brucei*, is transported into the lysosome of the parasite. Thus, these VS-RNA aptamer bioconjugates might help minimizing side effects of cysteine protease inhibitors in the long run.

In summary, this work provides detailed information on the structure of pro-rhodesain, its pH-dependent auto-activation and the drug-target interactions between rhodesain and vinyl sulfone based inhibitors. These insights as well as methods and strategies that have been developed to examine the protease and its interactions with small molecules enable further investigation and optimization of potential drug candidates.

Zusammenfassung

Johannes Gutenberg-Universität

Institut für Pharmazeutische und Biomedizinische Wissenschaften

Biochemische und biophysikalische Untersuchung der parasitären Cysteinprotease Rhodesain und deren Inhibition durch kovalent-reversible Inhibitoren

von Patrick Johe

Trotz der hohen Sterblichkeitsrate und der großen Anzahl gefährdeter Personen gilt die *Human African Trypanosomiasis* (**HAT**), auch Schlafkrankheit genannt, nach Angaben der *World Health Organization* (**WHO**) immer noch zu den vernachlässigten Tropenkrankheiten. HAT wird durch verschiedene Unterarten afrikanischer Trypanosomen verursacht, bei denen es sich um einzellige Parasiten handelt, die während der Blutmahlzeit einer Tse-Tse-Fliege auf den Wirt übertragen werden. Derzeit sind nur sechs Medikamente mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verfügbar. Zudem wurden gegen einige dieser Medikamente bereits Resistenzen gemeldet. Daher ist die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien gegen die Schlafkrankheit dringend erforderlich.

Eine vielversprechende zelluläre Zielstruktur (*target*) ist die **Cathepsin L-Protease (CathL)** von *Trypanosoma brucei rhodesiense* (**TbCathL** oder Rhodesain). Dieses Enzym ist für das Überleben des Parasiten essenziell und ist zudem an dessen Pathogenität beteiligt, da es den Trypanosomen unter anderem ermöglicht die Blut-Hirn-Schranke des Wirts zu überwinden und dessen Immunsystem zu umgehen.

Wie auch lysosomale Proteasen anderer Organismen wird Rhodesain als inaktive Pro-Form exprimiert, welche durch Abspaltung des N-terminalen Propeptids zur katalytisch aktiven Protease reift. Um die strukturellen Grundlagen dieses Reifungsprozesses, insbesondere in Bezug auf die Autoinhibition der Protease durch ihr Propeptid, aufzuklären, wurde erstmals die Struktur von Pro-Rhodesain mittels Röntgenkristallographie gelöst. Interessanterweise bildet das Propeptid eine trypanosomenspezifische α -Helix, die das aktive Zentrum blockiert und molekulare Wechselwirkungen mit der katalytischen Domäne eingeht, die an den kovalenten Cysteinprotease-Inhibitor K11777 erinnern. Die Kristallstruktur liefert daher eine rationale Erklärung für die Effizienz dieses Inhibitors.

Die Pro-Rhodesain-Kristallstruktur bildet zudem die Grundlage für die Untersuchung der pH-abhängigen Autoaktivierung des Rhodesain-Zymogens durch eine Kombination aus *molecular dynamic*-Simulationen (**MD**), Mutagenesestudien und verschiedenen spektroskopischen Messungen. Diese Untersuchungen wurden durch die Etablierung eines heterologen Expressions- und Reinigungsprotokolls für Rhodesain aus *E. coli* ermöglicht.

Darüber hinaus wurden erstmalig die thermodynamischen und kinetischen Parameter der Bindung von Rhodesain mit verschiedenen (α -Fluoro-)Vinylsulfonen (**VS**), die das Enzym kovalent reversibel oder

irreversibel inhibieren, mittels *isothermal titration calorimetry* (ITC) und *photoinduced electron transfer-fluorescence correlation spectroscopy* (PET-FCS) aufgeklärt.

Um gezielt Rhodesain inhibieren zu können, müssen die Inhibitoren das Lysosom des Trypanosoms erreichen, in welchem die Cysteinprotease lokalisiert ist. Daher wurden Synthese- und Analysemöglichkeiten eines Organell-spezifischen *drug delivery*-Systems untersucht, welches auf VS-RNA-Aptamer-Biokonjugaten basiert. Dieser Ansatz wurde von einem RNA-Aptamer inspiriert, das nach Bindung an die flagellare Tasche von *T. brucei* in das Lysosom des Parasiten transportiert wird. Somit könnten diese VS-RNA-Aptamer-Biokonjugate dazu beitragen, die Nebenwirkungen von Cysteinprotease-Inhibitoren auf lange Sicht zu minimieren.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit detaillierte Informationen über die Struktur von Pro-Rhodesain, dessen pH-abhängige Autoaktivierung und die *drug-target*-Wechselwirkungen zwischen Rhodesain und Vinylsulfonen. Die Erkenntnisse, Methoden und Strategien, die zur Untersuchung der Protease und ihrer Interaktionen mit kleinen Molekülen entwickelt wurden, ermöglichen somit die Charakterisierung und Optimierungen weiterer potenzieller Wirkstoffkandidaten.

Inhaltsangabe

1	Einleitung	1
1.1	Die Schlafkrankheit.....	1
1.2	Therapie der Schlafkrankheit	2
1.3	Trypanosomen.....	4
1.4	Rhodesain und andere Cathepsin L-Proteasen	8
1.5	Struktur der Pro-Domänen in Cathepsin L-Zymogenen	12
1.6	Substraterkennung und Hydrolysemechanismus der CathL-Proteasen.....	15
1.7	Kovalente Inhibitoren	18
1.8	Aptamere als Therapeutika	23
2	Zielsetzung und Motivation.....	27
3	Strukturanalyse und Charakterisierung von (Pro-)Rhodesain	29
3.1	Heterologe Expression von Rhodesain	29
3.1.1	Expression und Reinigung von Rhodesain in <i>Pichia pastoris</i>	30
3.1.2	Isotopen-Markierung von Rhodesain für NMR Studien	31
3.1.3	Etablierung eines Expressions- und Reinigungsprotokolls von Rhodesain aus <i>E. coli</i> ..	32
3.2	Erstmalige Lösung der Kristallstruktur von Pro-Rhodesain	39
3.2.1	Kristallisation von Pro-Rhodesain	39
3.2.2	Lösung und Beschreibung der Struktur von Pro-Rhodesain.....	40
3.2.3	Wechselwirkung innerhalb der Pro-Domäne	43
3.2.4	Wechselwirkung zwischen der katalytischen Domäne und der Pro-Domäne.....	44
3.2.5	Helix 4 – Ein besonderes <i>Feature</i> im Rhodesain-Propeptid.....	46
3.3	Untersuchung der Autoaktivierung von Pro-Rhodesain	52
3.3.1	Die Autoaktivierung von Pro-Rhodesain beinhaltet einem pH-abhängigen <i>trans-cleavage</i> -Prozess.....	52
3.3.2	Struktur von Pro-Rhodesain bleibt unter sauren Bedingungen erhalten	54
3.3.3	MD-Simulationen geben Hinweis auf Trigger der pH-induzierten Autoaktivierung	59
3.3.4	Beschreibung der MD-Simulationen.....	60
3.3.5	Ergebnisse der MD-Simulationen bezogen auf die Interaktionen einzelner Aminosäuren	62
3.3.6	Mutationsstudien zur Untersuchung möglicher pH-sensitiver Trigger.....	68
3.3.7	Das <i>blocking peptide</i> als mögliches Substrat	72
3.4	Zusammenfassung und Diskussion des Abschnitts 3.....	75
4	Biophysikalische Charakterisierung der Rhodesain-(α -Fluoro-) Vinylsulfon-Bindung	79
4.1	Markierung von Rhodesain.....	79
4.2	SPR-Messungen.....	84
4.3	Microscale Thermophoresis	87

4.4	Isothermale Titrationskalorimetrie	89
4.5	<i>kin</i> ITC-ETC.....	95
4.6	Rhodesain-Q127W-Mutante ermöglicht PET-FCS-Experimente und Einblicke in die Bindungskinetik von VS-basierten Inhibitoren	98
4.6.1	MD-Simulationen zur Untersuchung des Atto-VS/Rhodesain-Q127W-Systems	101
4.6.2	Bestimmung der Bindungskinetiken von VS an Rhodesain durch <i>rapid-mixing</i> - Experimente.....	104
4.7	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse des Abschnitts 4	106
5	Vinylsulfon-RNA-Biokonjugate zur gezielten Adressierung der parasitären Cysteinprotease Rhodesain	109
5.1	Konjugation kleiner Moleküle an RNA	109
5.2	Kopplung von Vinylsulfon-basierten Inhibitoren an Modell-RNA	112
5.3	Kombination aus RNase T1-Verdau und LC-MS zur Analyse großer RNA	116
5.4	Synthese des RNA-Aptamer 2-16 Derivats.....	118
5.5	LC-MS basierte Analyse des IVT-Produkts.....	121
5.6	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse von Abschnitt 5	124
6	Rhodesain zeigt eine unerwartete Esteraseaktivität.....	125
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	133
8	Material und Methoden.....	139
8.1	Grundlagen der PET-FCS-Experimente.....	139
8.2	Verwendete Programme	143
8.3	Verwendete Laborgeräte	144
8.4	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	146
8.5	Biochemische Analysemethoden.....	147
8.5.1	SDS-PAGE.....	147
8.5.2	Western-Blot	147
8.5.3	Agarosegel-Elektrophorese	148
8.5.4	CD-Spektroskopie	148
8.6	Heterologe Proteinexpression von Rhodesain in <i>P. pastoris</i>	150
8.6.1	Gewinnung von WT-Rhodesain aus <i>P. pastoris</i>	150
8.6.2	Gewinnung von ¹⁵ N-markiertem Rhodesain aus <i>P. pastoris</i>	151
8.6.3	Gewinnung von ¹³ C/ ¹⁵ N-markiertem Rhodesain aus <i>P. pastoris</i>	152
8.7	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	153
8.7.1	Vorbereitung chemisch kompetenter Zellen	153
8.7.2	Transformation.....	153
8.7.3	Expression von (Pro-)Rhodesain in <i>E. coli</i>	153
8.7.4	Isolierung von katalytisch aktivem Rhodesain aus <i>E. coli</i>	154
8.7.5	Gewinnung von katalytisch inaktivem Rhodesain aus <i>E. coli</i>	155
8.7.6	Expression von T7-RNA-Polymerase	156

8.8	Methoden zur Charakterisierung von Rhodospirillum rubrum-Inhibitor-Bindungen.....	157
8.8.1	ITC-Messung	157
8.8.2	MST-Messungen.....	158
8.8.3	SPR-Messungen.....	158
8.8.4	Fluoreszenzbasierter Enzymassay.....	159
8.9	Kristallisation, X-ray-Messung und Lösung der Kristallstruktur	161
8.10	Rhodospirillum rubrum-Markierung.....	162
8.11	Gel- <i>shift</i> -Assay.....	164
8.12	Autoaktivierungsassay	165
8.13	Verdau des trypanosomalen <i>blocking peptide</i> durch Rhodospirillum rubrum.....	165
8.14	Hydrolyse-Assays der Verbindung 4.8	165
8.15	Verdünnungsassay	166
8.16	RNA-Synthese und -Modifikationen	166
8.16.1	Amplifizierung des IVT- <i>templates</i>	166
8.16.2	<i>AseI</i> -Verdau	168
8.16.3	IVT	168
8.16.4	Phenol/Chloroform-Extraktion	168
8.16.5	RNA-Fällung.....	169
8.16.6	Oxidation von RNA-Molekülen <i>via</i> Malaprade-Reaktion	169
8.16.7	Kopplung durch reduktive Aminierung	170
8.16.8	RNase T1-Verdau	170
8.16.9	PAGE-Gele	170
8.16.10	Allgemeine LC-MS-Methoden	171
8.17	Verwendete Plasmide und DNA-Konstrukte.....	173
8.18	Mutanten und Klonierungsmethoden.....	181
8.18.1	<i>Site directed mutagenesis</i>	181
8.18.2	Gibson- <i>assembly</i>	184
8.18.3	Sequenzierung.....	185
9	Abbildungsverzeichnis	187
10	Anhang	193
10.1	MD-Simulationen.....	193
10.2	SDS-PAGE-Gele des Gel- <i>shift</i> -Assays.....	204
10.3	Chromatogramme und Massenspektren der Hydrolyse des trypanosomalen <i>blocking peptide</i> durch Rhodospirillum rubrum	207
10.4	Chromatogramme und Massenspektren der Hydrolyse von Verb. 4.7 durch Rhodospirillum rubrum ..	209
10.5	Liste verwendeter Inhibitoren	214
10.6	Vollständige PAGE-Gele des Abschnitts.....	218

10.7	LC-MS-Laufe des Kapitels 5	219
11	Quellen.....	223
	Curriculum Vitae.....	235
	Publikationen.....	236

1 Einleitung

1.1 Die Schlafkrankheit

Die afrikanische Schlafkrankheit oder *Human African Trypanosomiasis (HAT)* wird durch die Infektion mit einzelligen Parasiten, den Trypanosomen, verursacht, welche durch den Stich der Tse-Tse-Fliege übertragen werden. Obwohl weltweit von 10,000 neuen Fällen pro Jahr berichtet wird und weitere 70 Millionen Menschen in gefährdeten Gebieten leben, wird die Schlafkrankheit von der *world health organisation (WHO)* als vernachlässigte Tropenkrankheit oder *neglected tropical disease (NTD)* eingestuft.^{[1][2]} Grund dafür ist, dass hauptsächlich wirtschaftlich schwache Gebiete betroffen sind und entsprechend wenig Geld in die Forschung und Entwicklung neuer Therapieansätze investiert wird.

Es wird zwischen der westafrikanischen und der ostafrikanischen Schlafkrankheit unterschieden, die durch verschiedene *Trypanosoma brucei*-Subspezies, *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense*, verursacht werden.^[3] Gelangen die Parasiten in den Blutkreislauf des Wirtes, verläuft die Krankheit in zwei Stadien (siehe Abbildung 1). Die erste Phase ist das hämolymphatische Stadium, in welchem sich die Parasiten im Blut sowie im lymphatischen System des Wirtes ausbreiten. Dabei treten erste grippeartige Symptome wie Kopf- und Gliederschmerzen, Fieber, Schwächeanfälle und Steifheit der Glieder auf. Im nachfolgenden, zweiten Stadium überwinden die Trypanosomen die Blut-Hirn-Schranke (*blood brain barrier, BBB*), wodurch charakteristische und namensgebende Symptome wie psychische Störungen, Krampfanfälle und Koma in Erscheinung treten.^[4] Bleibt die Krankheit unbehandelt führt sie unweigerlich zum Tod des Patienten.^[5]

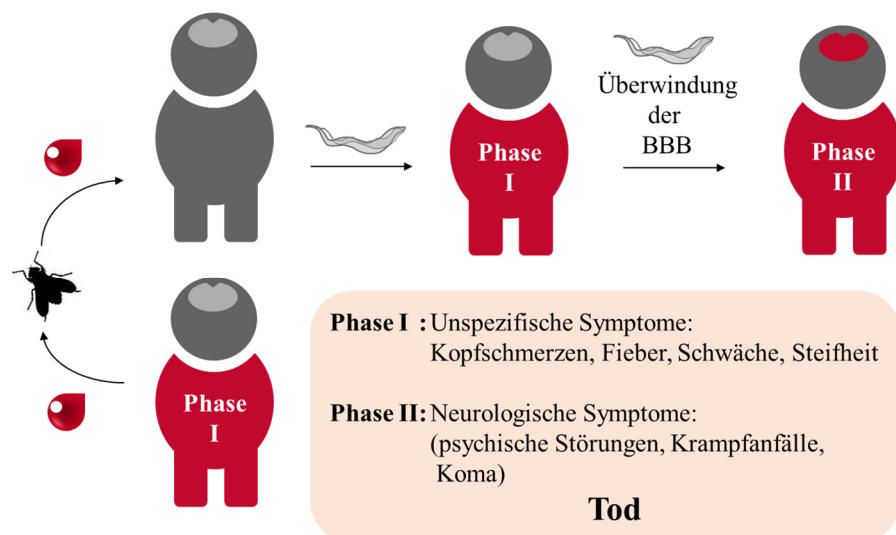


Abbildung 1: Einteilung der **Human African Trypanosomiasis (HAT)** in zwei Phasen und deren Symptome. In der ersten hämolymphatischen Phase I verbreiten sich die Trypanosomen im Blut und im lymphatischen System. In der neurologischen Phase II haben die Parasiten die **blood brain barrier (BBB)** überwunden. Die Übertragung der Trypanosomen geschieht durch den Stich der Tse-Tse-Fliege, die den Parasiten als Vektor dient.

1.2 Therapie der Schlafkrankheit

Zur Behandlung der *Human African Trypanosomiasis* (HAT) stehen derzeit nur sechs Medikamente (Suramin, Pentamidin, Eflornithin, Melarsoprol, Nifurtimox und Fixinidazol) zur Verfügung, wobei Suramin und Pentamidin nur im ersten Stadium der Schlafkrankheit eingesetzt werden können (siehe Tabelle 5). Während gegen *T. b. gambiense* mehrere Medikamente im zweiten Stadium zur Verfügung stehen, kann bei einer *T. b. rhodesiense*-Infektion nur Melarsoprol eingesetzt werden. Große Nachteile dieser Therapien sind ihre starken Nebenwirkungen, welche zusätzlich ein hohes Risiko für die Patienten bergen. So liegt die Mortalitätsrate bei einer Behandlung mit Melarsoprol bei 5%. Alarmierend ist weiterhin, dass bereits Resistenzen gegen zwei der drei aktuellen Wirkstoffe gegen das zweite Stadium einer Trypanosomen-Infektion beschrieben wurden.^{[6][7]} Daher ist die Erforschung neuer Therapieansätze und weiterer Arzneistoffe dringend erforderlich.

Eine mögliche neue Wirkstoffklasse zur Behandlung der Schlafkrankheit könnten Inhibitoren trypanosomaler Cathepsine darstellen, da diese Proteasen eine überlebenswichtige Rolle im Stoffwechsel der Parasiten einnehmen. Ein prominentes Beispiel für einen solchen Ansatz ist der Vinylsulfon-basierte Inhibitor K11777.

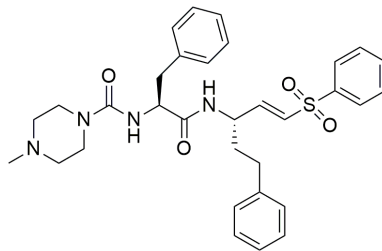
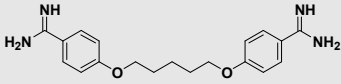
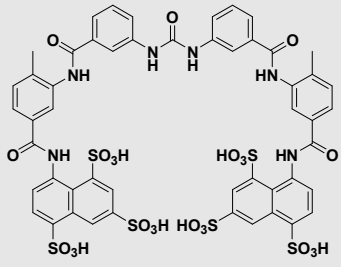
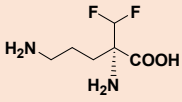
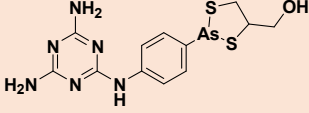
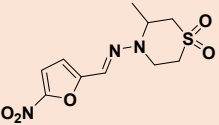
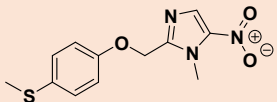


Abbildung 2: Struktur von K11777

K11777 ist ein peptidischer, kovalent-irreversibler Inhibitor, der selektiv an Cystein-Proteasen bindet, ohne Reaktionen mit Serin-Proteasen oder nicht aktivierten Cysteinen einzugehen. Er zeigt eine akzeptable orale Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik ohne mutagene Eigenschaften. In präklinischen Studien zur Behandlung der Chagas-Krankheit an Nagetieren, Hunden und Primaten konnte K11777 bereits erfolgreich eingesetzt werden. Auch wurden erste klinische Studien der Phase I zur Wirksamkeit gegenüber der Schlafkrankheit durchgeführt.^[8] Allerdings sind bislang keine weiteren Informationen verfügbar. Dennoch bietet K11777 eine gute Grundlage für die Entwicklung weiterer Wirkstoffe.

Tabelle 5: Strukturformeln der Wirkstoffe, welche zur Behandlung der Schlafkrankheit zur Verfügung stehen. Die Einteilung erfolgt nach dem Stadium der Infektion zu dem die jeweiligen Stoffe eingesetzt werden.

	Wirkstoff	Indikation	Resistenz (-mechanismus)
Phase I	 Pentamidin	<i>T. b. gambiense</i>	Mutation des <i>TbAT1/P2</i> -Transporters und Verlust des Aquaporin 2-Transporters ^{[9][10]}
	 Suramin	<i>T. b. rhodesiense</i>	Nicht beschrieben
Phase II	 Eflornithin	<i>T. b. gambiense</i> ; <i>T. cruzi</i>	Verlust des <i>TbAAT6</i> Transporters ^[7]
	 Melarsoprol	<i>T. b. gambiense</i> ; <i>T. b. rhodesiense</i>	Mutation des <i>TbAT1/P2</i> -Transporters und des Aquaporin 2-Transporters ^{[10][11][12]}
	 Nifurtimox	<i>T. b. gambiense</i> ; <i>T. cruzi</i>	Nicht beschrieben
	 Fexinidazol	<i>T. b. gambiense</i>	Nicht beschrieben

1.3 Trypanosomen

Trypanosomen sind eine Familie einzelliger, geißeltragender Parasiten, welche zu den Kinetoplastiden oder Protozoen gezählt werden. Einzelne Trypanosomen-Arten unterscheiden sich bezüglich der Wirte und Vektoren, welche sie für ihre Verbreitungs- und Vermehrungszyklen nutzen.^[13] Zudem lassen sich diese Organismen in intra- und extrazelluläre Parasiten einteilen, abhängig davon, ob sie nach der Infektion in Wirtszellen eindringen oder ob sie sich frei im Blutstrom vermehren.

Die einzigen humanpathogenen Stämme bilden *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), welche Auslöser der südamerikanischen Chagas-Krankheit sind, und *Trypanosoma brucei*, welche die afrikanische Schlafkrankheit verursachen.^[14] Dabei handelt es sich bei *T. cruzi* um intrazelluläre Parasiten, welche beispielsweise Makrophagen befallen und sich in deren Cytoplasma vermehren können.^[15] Innerhalb der *T. brucei*, welche ausschließlich extrazellulär vorkommen, gibt es nur zwei humanpathogene Untergattungen: *T. b. gambiense* (Auslöser der westafrikanischen Schlafkrankheit) und *T. b. rhodesiense* (Auslöser der ostafrikanischen Schlafkrankheit).^{[16][17][18]}

Im Fall von *T. b. rhodesiense* wird das Überleben im menschlichen Blut durch das parasitäre *serum resistance-associated* (SRA)-Protein ermöglicht, das an die beiden *trypanosome lytic factors* (TLFs) TLF-1 und TLF-2 des Wirts binden kann. Die TLFs sind Multiproteinkomplexe, die viele Komponenten mit Lipoproteinen hoher Dichte (*high-density lipoprotein*) gemein haben und unter anderem das *haptoglobin-related protein* (HbRP) und das Apolipoprotein L1 (APOL1) beinhalten.^{[19][20][21]} Bei einer Trypanosomeninfektion reagiert das angeborene, humane Immunsystem durch Bindung der TLFs an den trypanosomalenen Haptoglobin-Haemoglobin-Rezeptor (HbHR) über die HbRP-Untereinheit. Dies führt zur Endozytose und Transport von TLF-1 in das Lysosom des Parasiten, wodurch es zur Insertion der porenformenden APOL1-Untereinheit in die Membran der Endosomen bzw. Lysosomen kommt. Die anschließende Lyse der Organellen führt zum Tod der Parasiten.^{[22][23][24]}

Durch die Komplexbildung der TLFs durch SRA kann der Parasit vor der Lyse durch das angeborene Immunsystem geschützt werden und überleben.^{[25][26]}

Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen *inhibitors of cysteine peptidase* (ICP)-Proteinen und der Sensitivität der Trypanosomen gegenüber humanem Serum nachgewiesen werden.^[27] Bei ICPs handelt es sich um proteinbasierte Cysteinprotease-Inhibitoren die eine Möglichkeit für eukaryotische Zellen darstellen, die Aktivität ihrer eigenen Proteasen zu regulieren.^[28] In Trypanosomen wurde beobachtet, dass ein Defizit an ICPs zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber humanem Serum führt. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass TLF durch trypanosomale Cathepsine abgebaut wird. Gestützt wird diese Annahme durch eine weitere Studie, in welcher eine Inhibition trypanosomaler Cathepsine durch *small molecules* zu einer Anreicherung von TLF in den Lysosomen der Parasiten führte.^[29]

Neben den Strategien dem angeborenen Immunsystem des Wirts zu entgehen, haben die Parasiten weitere Mechanismen entwickelt, um auch dem adaptiven Immunsystem auszuweichen. So präsentieren sie auf ihrer Zelloberfläche eine 12 – 15 nm dicke Schicht bestehend aus variablen N-glycosylierten Oberflächenglykoproteinen oder auch *variant surface glycoproteins* (VSGs) genannt. Durch diese undurchdringliche Schicht können die Immunproteine des Wirts die Zelloberfläche des Parasiten nicht erreichen und keine Antikörper gegen nicht-variable Oberflächenproteine generieren.^[30] Obwohl ein einzelnes Trypanosom stets nur einen VSG-Typ ausbildet, kommt es innerhalb der Populationen regelmäßig zu Variationen dieser Proteine.^{[31][32]} Dies führt dazu, dass das Immunsystem des Wirts die neuen Subpopulationen nicht mehr erkennen kann und sich im Verlauf der Krankheit stetig neu anpassen muss, bis es letztlich nicht mehr in der Lage ist diese zu unterdrücken.^[33]

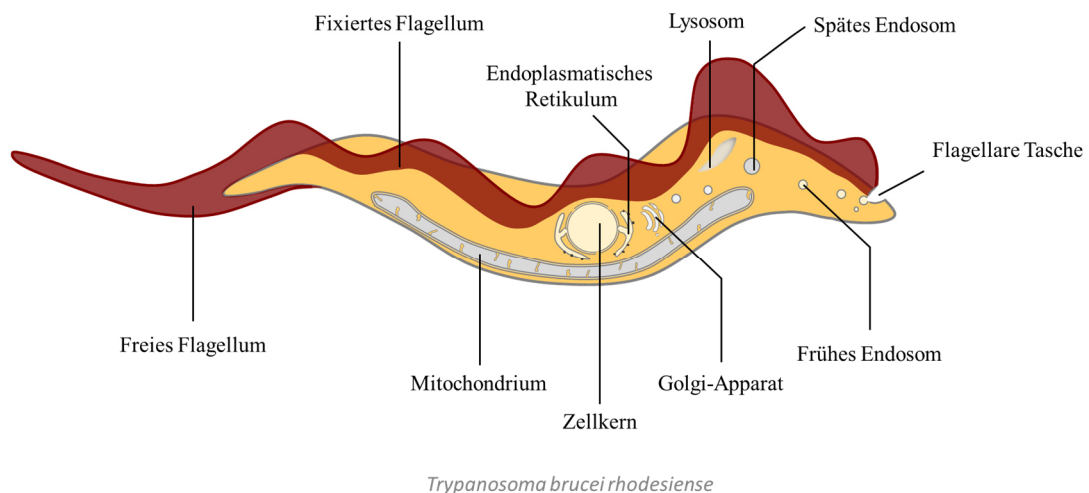


Abbildung 3: Schematische Darstellung des *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

Trypanosomen zeichnen sich durch einige zelluläre Besonderheiten im Vergleich zu anderen eukaryotischen Zellen aus, wie z.B. einer spezialisierten Zellregion, die sogenannte flagellare Tasche (siehe Abbildung 3), welche die gesamte Exo- und Endozytoseaktivität des Parasiten übernimmt. Trotz der relativ kleinen Fläche, die diese Vertiefung am posterioren Ende des Trypanosoms einnimmt, ist es den Parasiten möglich, ihre gesamte Zelloberfläche innerhalb von 12 Minuten über Endo- und Exozytoseprozesse auszutauschen.^{[34][35]} Durch diesen Endo- und Exozytosekreislauf werden VSGs stetig endozytiert, wobei sie von Antikörpern befreit und durch Rücktransport an die Zelloberfläche recycelt werden.^[35] Der Transport der VSGs zur flagellaren Tasche erfolgt durch die Scherkräfte, denen der Parasit im Blut durch seine Schwimmbewegungen ausgesetzt ist.

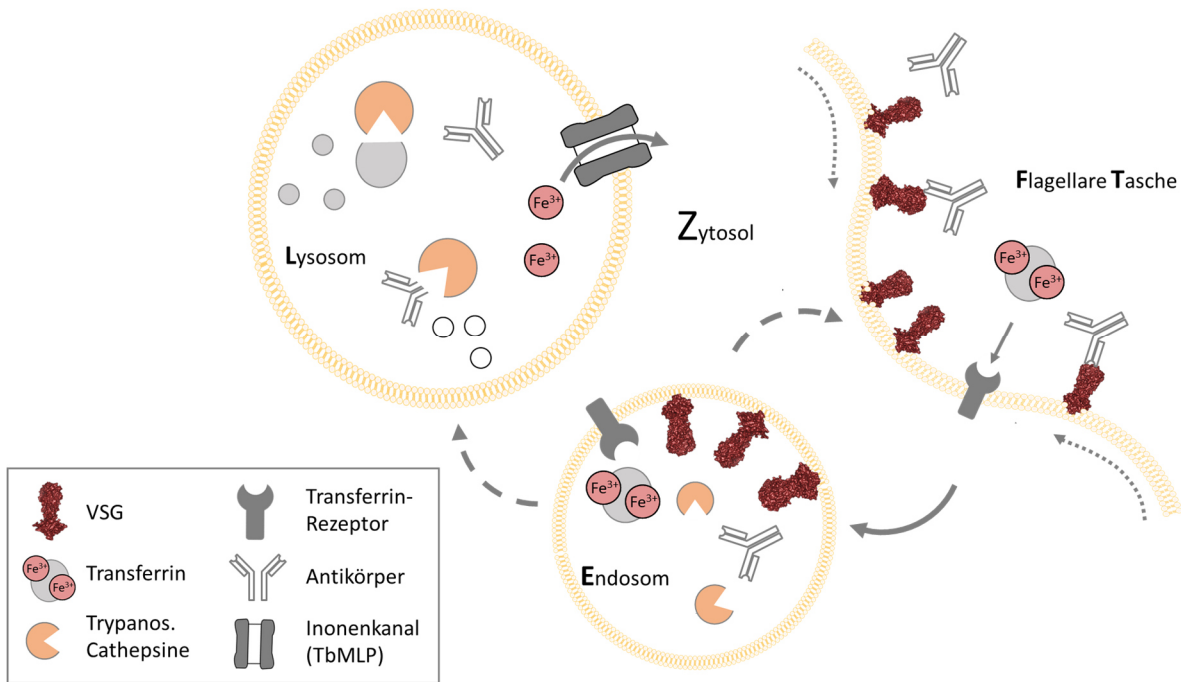


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Endo- und Exozytosekreislaufs in *T. brucei*. Scherkräfte durch Trypanosomenbewegung (gepunktete Pfeile) bewegen die Oberflächenproteine zur flagellaren Tasche, welche der zentrale Ort für Endo- und Exozytoseprozesse ist. In dieser Vertiefung kommt es außerdem zur Bindung von Transferrin an Transferrin-Rezeptoren. Durch Endozytose aufgenommene Proteine gelangen in Endosomen; von woraus sie entweder zum Recyceln an die Zelloberfläche oder zum proteolytischen Abbau (u.a. durch trypanosomale Cathepsine) ins Lysosom transportiert werden.

Da die flagellare Tasche die einzige Stelle der Zellmembran ist, über die Endozytose betrieben wird, werden über sie auch Nährstoffe und Spurenelemente aufgenommen, welche entscheidend für das Überleben des Parasiten sind.^[36] Zur Aufnahme von Eisen etwa binden Trypanosomen das Wirtsprotein Transferrin, welches von Wirbeltieren zum Eisentransport im Blut genutzt wird. Die Bindung des Transferrins geschieht innerhalb der flagellaren Tasche durch Transferrin-Rezeptoren, welche sich strukturell stark von denen des Wirts unterscheiden, jedoch große Ähnlichkeit zu den VSGs aufweisen.^[37] Nach Bindung des Transferrins und anschließender Endozytose, werden die Rezeptoren in Endosomen transportiert. Hier führt das Sinken des pH-Werts zur Freisetzung des Transferrins und des gebundenen Eisens. Während die Rezeptoren zurück zur Zelloberfläche gebracht werden, gelangen die Transferrin-Proteine in das Lysosom, wo sie durch trypanosomale **Cathepsine** (**TbCathB** und **Rhodesain**) abgebaut werden.^{[38][39][40]} Das freigesetzte Eisen gelangt dann mittels des Eisenkanals *Trypanosoma brucei* **muco-lipin-like protein** (**TbMLP**) ins Zytosol, wo es den Parasiten nun für weitere überlebenswichtige Prozesse zur Verfügung steht.^[41]

Neben dem lysosomalen Abbau von Transferrin, nutzt *T. b. rhodesiense* sekretiertes **Rhodesain** zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke des Wirts.^[42]

Dabei induziert die Protease durch Hydrolyse eines G_{α} -protein-coupled receptors (GPCR), dem *protease activated receptors-2* (PAR-2), eine Ca^{2+} -Efflux-abhängige Signalkaskade in den Epithelzellen des Wirts, welche den Trypanosomen das Eindringen in das ZNS ermöglicht.

Dies konnte durch Inkubation von Monolayerschichten aus *human brain microvascular endothelial cells* (HBMECs), die die Blut-Hirn-Schranke imitieren, mit Trypanosomen gezeigt werden. Dabei wurde ein Ca^{2+} -Efflux aus dem ER der HBMECs in deren Zytosol und eine darauf folgende Überwindung der Monolayer durch die Parasiten beobachtet.^[42] Die Zugabe von bekannten Cysteinprotease-Inhibitoren unterdrückte den Ca^{2+} -Efflux sowie den Trypanosomendurchtritt. Auch eine Ca^{2+} -Komplexierung durch den Chelator BAPTA-AM verhinderte diesen.

Des Weiteren ließ sich durch einen RNAi-*knock down* des PAR-2 der HBMECs neben der Reduktion der Parasitendurchtritte auch ein Anstieg des Calcium-Levels im Vergleich zu Kontrolleexperimenten ohne Trypanosomen unterdrücken.^[43]

Auch eine direkte Degradation der *tight junctions* (TJ)- und *adhering junctions* (AJ)-Proteine, wie beispielsweise Cadherin oder Claudin, zwischen Epithelzellen durch sekretiertes Rhodensain ist denkbar. Obwohl ein solcher Mechanismus nie direkt nachgewiesen wurde, könnte der Verlust von TJs und AJs zu einer Lockerung der BBB-Zellschicht führen und den Trypanosomen somit das Eindringen in das ZNS ermöglichen.^[43]

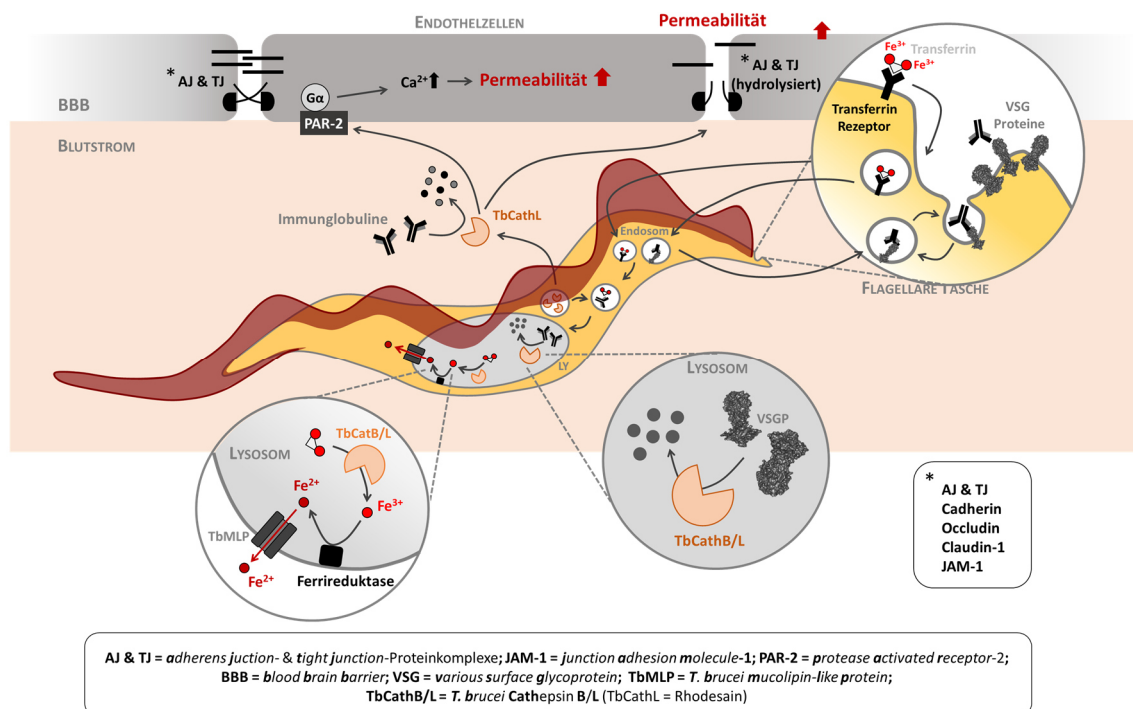


Abbildung 5: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen (humanpathogenen) Hydrolyseprozesse, an denen Rhodensain beteiligt ist. Gezeigt ist dessen Beteiligung an der Eisenhomöostase und der Verteidigung gegen das Immunsystem des Wirts durch die Hydrolyse endozytierter Proteine wie humanem Transferrin und Antikörpern. Zudem ist die Rolle von Rhodensain beim Überwinden der BBB durch das Auslösen einer postulierten Signalkaskade in humanen Endothelzellen dargestellt. Diese beginnt mit der Hydrolyse von PAR-2 an der Zelloberfläche von Endothelzellen, welche letztlich zu einer erhöhten Permeabilität führt und den Trypanosomendurchtritt ermöglicht. Des Weiteren wird auch eine direkte Hydrolyse von adherens junction und tight junction Proteinkomplexen durch Rhodensain diskutiert.

1.4 Rhodesain und andere Cathepsin L-Proteasen

Der Begriff Proteasen beschreibt Enzyme, welche die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren, weshalb sie basierend auf der Klassifizierung der *Enzyme Commission* (EC) der Kategorie der Hydrolasen und Unterkategorie der Peptidasen (EC 3.4) angehören.^[44] Ihre proteolytische Funktion ist für Zellen unentbehrlich, da sie nicht nur für den Abbau von Proteinen, sondern auch für deren Reifungsprozess verantwortlich sind.^[45] In vielen Fällen nehmen sie somit eine entscheidende Rolle in der Regulation unterschiedlichster physiologischer Signalwege ein. Aus ihrer Beteiligung an Prozessen wie Apoptose, Immunreaktionen und der Regulation des Blutdrucks geht auch ihre Attraktivität als mögliche Zielstrukturen (*targets*) zur Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Behandlung assoziierter Krankheiten hervor.^{[46][47][48]}

Innerhalb der Proteasen unterscheidet man zwischen Exo- und Endo-Peptidasen, wobei erstere die Hydrolyse an den Termini einer Peptidkette katalysieren und letztere Peptidbindungen innerhalb der Kette spalten. Basierend auf dem MEROPS-System unterteilt man Proteasen hinsichtlich ihrer Aminosäuren (AS) im aktiven Zentrum, welche an der Katalyse beteiligt sind. Die größten Fraktionen bilden dabei Aspartat-, Metallo-, Serin/Threonin- und Cysteinproteasen.^[49] Diese werden weiterhin in Clans (oder Superfamilien) und Familien eingeteilt. Dabei haben alle Mitglieder eines Clans denselben evolutionären Ursprung, während Enzyme einer Familie signifikante Ähnlichkeiten in ihrer Primärstruktur aufweisen.

Rhodesain, auch *Trypanosoma brucei* Cathepsin L (TbCathL), Brucipain oder Trypanopain genannt, ist neben TbCathB die wichtigste lysosomale Protease des Parasiten *Trypanosoma brucei rhodesiense*.^{[38][50]} Rhodesain, ist Mitglied der C1-, Cathepsin-L oder Papain-Familie, wodurch es dem Clan CA angehört. Da es im Gegensatz zu TbCathB konstitutiv exprimiert wird, gilt es als Hauptprotease der Parasiten.

Zu den Aufgaben von Rhodesain zählen die Umgehung des Immunsystems des Wirts durch Degradation von Immunoproteinen sowie die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (*blood brain barrier*, **BBB**). Darüber hinaus nimmt Rhodesain Einfluss auf das Wachstum und die Proliferation der Parasiten und trägt durch den Abbau von Transferrin zur parasitären Eisenhomöostase bei.^{[39][42]}

Allerdings werden TbCathB und Rhodesain bezüglich ihrer Relevanz in der Literatur kontrovers diskutiert, denn *in vivo*-Studien an *T. brucei*-infizierten Mäusen zeigten, dass das *silencing* von TbCathB mittels RNAi zu einem Rückgang der Trypanosomenpopulation und zum Überleben der Tiere führte. Ein *silencing* von Rhodesain hatte in derselben Studie jedoch nur einen geringen Effekt.^[51] Allerdings kam es in diesen Versuchen nie zu einem vollständigen *knock down* von Rhodesain, weshalb nicht ausgeschlossen werden konnte, dass dessen katalytische Restaktivität ausreichend für das Überleben der Parasiten war. In aktuelleren Experimenten konnte hingegen eine verminderte Wachstumsrate der Trypanosomen durch das *silencing* von Rhodesain mittels RNAi erreicht werden.^[27]

Außerdem zeigte eine *in vitro*-Studie an *T. b. brucei*-Kulturen, dass eine vollständige Inhibition von Rhodesain durch selektive Inhibitoren einen deutlichen Effekt auf die Wachstumsrate zur Folge hatte, während dies bei einer vollständigen Inhibition von TbCathB nicht beobachtet wurde.^[39]

Zusammengefasst deuten diese Resultate darauf hin, dass Rhodesain eine entscheidendere Rolle gegenüber TbCathB im Wachstum und Überleben der Parasiten einnimmt. Auch zeigt die Beteiligung von Rhodesain an einer Vielzahl essenzieller Prozesse deutlich die Relevanz und das Potential dieses Enzyms als *target* zur Behandlung der Schlafkrankheit.

Wie alle lysosomalen Proteasen wird auch Rhodesain zunächst als inaktives Vorläuferprotein (Zymogen) exprimiert. Von den 450 Aminosäuren des Pro-Rhodesains bilden die ersten 29 N-terminalen AS ein Signalpeptid, gefolgt von einem 105 AS-langen Propeptid, auf dessen Struktur im Kapitel 1.5 detaillierter eingegangen wird. Die nachfolgenden 214 AS bilden die katalytische Domäne, an welche sich eine C-terminale Domäne anschließt.^[52] Letztere ist trypanosomenspezifisch und nicht in den Cathepsinen anderer Organismen zu finden. Es sind bislang zwar weder Struktur noch Funktion dieser Domäne aufgeklärt, jedoch scheint sie keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität des Enzyms zu haben.



Abbildung 6: Abfolge unterschiedlicher Domänen in (Pro-)Rhodesain. Dargestellt ist die Abfolge der unterschiedlichen Domänen von N- zum C-Terminus beginnend mit dem ER-Signalpeptid (SP).

Reifes Rhodesain und dessen Zymogen Pro-Rhodesain unterscheiden sich durch das Vorhandensein einer N-terminalen Pro-Domäne bzw. eines Propeptids. Diese Pro-Domäne fungiert als intramolekularer Inhibitor der Protease und erfüllt somit eine Schutzfunktion bis diese ihren subzellulären Bestimmungsort, das Lysosom, erreicht hat.^[53] Während des Transportweges zum Lysosom durchlaufen lysosomale Proteasen mehrere Stationen und werden einem zunehmend azideren pH-Wert ausgesetzt, welcher vom neutralen Milieu des endoplasmatischen Retikulums (ER) (pH 7.2) über den des Golgi-Apparats (pH 6.7 – 6) bis hin zum späten Endosom (pH 5.5) bzw. dem Lysosom (pH 4.7) stetig abfällt (siehe Abbildung 7).^[54]

Im Allgemeinen beginnt die Sortierung lysosomaler Proteasen zum Lysosom mit der Translation in das Lumen des ERs.^[55] Dabei wird die Proteinsynthese ins ER durch ein N-terminales Signalpeptid (SP) des naszierenden Proteins vermittelt, welches nach vollständiger Translation abgespalten wird. Gleichzeitig kommt es zur co-translationalen Glycosylierung des Zymogens. Diese Modifikation dient als Transportsignal zum Golgi-Apparat. Ausgehend vom Golgi-System werden die Proteasen in Clathrin-umschlossenen Vesikeln transportiert, welche dann mit späten Endosomen fusionieren. Die Endosomen verschmelzen wiederum mit den Lysosomen.

Als Transportsignal von CathL, CathB und CathD vom Golgi-Apparat zu Lysosomen dient in den meisten eukaryotischen Zellen eine **Mannose-6-phosphat (M6P)**-Modifikation. Das M6P-Signal wird im trans-Golgi-Netzwerk von **M6P-Rezeptoren (M6PR)** erkannt. Da weder M6P-Modifikationen noch homologe Proteine zu **M6PRs** in Trypanosomen nachgewiesen wurden, wird angenommen, dass eine Sortierung über Rezeptoren erfolgt, welche stattdessen peptidische Sequenzen erkennen.^[56] Bekannte Beispiele hierfür sind Sortiline aus Säugetieren oder Vsp10p aus Hefen, welche Signalsequenzen in den Pro-Domänen lysosomaler Hydrolasen erkennen und die Translokation vermitteln.^{[57][58]} In *T. brucei* existiert der Proteinkomplex AP-1 (*adaptor complex-1*) im Golgi-Apparat, welcher ebenfalls peptidische Sequenzen erkennt und einen Transport in Clathrin-Vesikeln induziert.^[59] Nach *silencing* dieses Rezeptors wurde beobachtet, dass sich Rhodesain weniger im Lysosom anreichert und stattdessen vermehrt sekretiert wird. Zusammengefasst lässt dies darauf schließen, dass ein Transport von trypanosomalen Proteasen zum Lysosom über peptidische Sequenzen in der Pro-Domäne vermittelt wird. Dies wurde in Experimenten mit Pro-Domäne-Chimären nachgewiesen. Die Fusion der Pro-Domänen parasitärer CathL-Proteasen aus *T. cruzi* oder *L. major* mit **green fluorescence protein (GFP)** führte in beiden Fällen zur Lokalisation und Grünfärbung des Lysosoms des jeweiligen Parasiten.^{[60][61]}

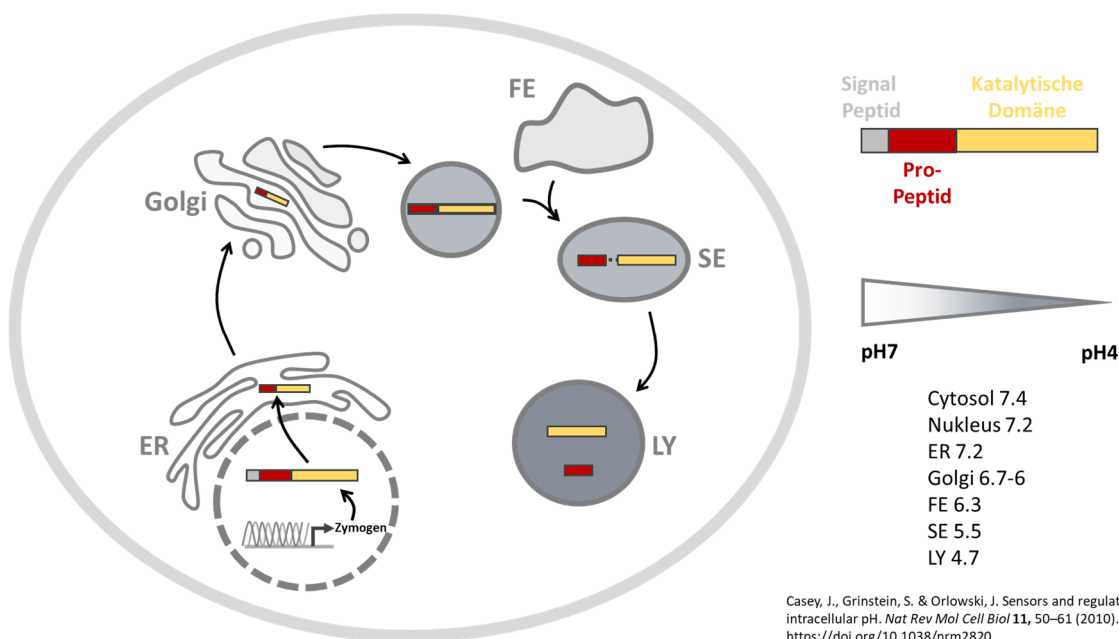


Abbildung 7: Reifungsprozess von Zymogenen lysosomaler Proteasen zu aktiven Enzymen während der Translokation vom endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Lysosom. Die Zymogene werden in das ER translatiert und von dort aus über den Golgi-Apparat zum späten Endosom (SE), welche aus frühen Endosomen (FE) reifen, und zum Lysosom (LY) transportiert. Der sinkende pH-Wert in den Endosomen induziert den Reifungsprozess der Proteasen und die damit verbundene Abspaltung der Pro-Domäne.^[54]

Erreicht das Zymogen seinen subzellularen Bestimmungsort, das Lysosom, kommt es zur Aktivierung durch die Abspaltung der Pro-Domäne, ein Prozess welcher als *maturing* oder Reifung bezeichnet wird. Die möglichen Mechanismen und Einflüsse, die diesen Abspaltungsprozess kontrollieren sind zahlreich und werden in der Literatur teilweise kontrovers diskutiert. So konnte in *in vivo*-Studien gezeigt werden,

dass die Reifung von Pro-CathL zu aktivem CathL möglicherweise abhängig von Cathepsin D-Aktivität ist. Andere Studien zeigten, dass die Aktivierung von CathL auch in Abwesenheit von CathD erfolgen kann, jedoch durch CathD beschleunigt wird.^{[62][63][64]}

Neben der Prozessierung durch andere lysosomale Proteasen gibt es auch Hinweise darauf, dass sich CathL unabhängig von anderen Proteasen autoaktivieren, d.h. die eigene Pro-Domäne abspalten kann. Ein rein CathL-abhängiger Reifungsprozess scheint möglich zu sein, da beobachtet wurde, dass isoliertes Pro-Cathepsin L reifen kann und sich dieser Prozess durch Protease-Inhibitoren wie HgCl₂ oder Phenylmethylsulfonylfluorid (**PMSF**) unterdrücken lässt.^[65] Ob dieser Prozess allerdings in *cis* (d.h. intramolekular, die eigene Protease-Domäne schneidet die mit ihr kovalent verbundene Pro-Domäne ab) und/oder in *trans* (d.h. intermolekular, eine bereits aktivierte Protease kann die Pro-Domäne anderer Proteasen abspalten) erfolgt, ist bislang unklar. Es existieren jedoch Hinweise darauf, dass sowohl *trans*- als auch *cis*-Schritte stattfinden.^[66]

Als Initiatoren für den Aktivierungsprozess werden vor allem chemische Einflüsse verantwortlich gemacht. Ein saurer pH-Wert, entsprechend den Bedingungen im Lysosom, gilt als Voraussetzung für die Aktivierung von CathL.^[67] Zudem beschleunigen weitere Effektoren, wie negative Ladungen von Dextransulfaten oder Glycosaminglycanen, die Aktivierung von CathB, CathL und Congopain, der CathL-Protease aus *T. congolense*.^{[68][69][70][71]}

Weiterhin ist fraglich, welche strukturellen Veränderungen durch das Sinken des pH-Wertes und/oder der Anwesenheit von Anionen ausgelöst werden, um den Reifungsprozess der Proteasen auszulösen. So wurden an der isolierten Pro-Domäne von humanem CathL spektroskopische Untersuchungen durchgeführt, in denen gezeigt werden konnte, dass sie unter basischen bis neutralen Bedingungen eine definierte Tertiärstruktur aufweist, die unter sauren Bedingungen in einen *molten globule*-Zustand übergeht.^[72] Im Gegensatz dazu konnten in Testungen an inaktivem Volllänge-Pro-CathL keine größeren, pH-abhängigen Strukturänderungen festgestellt werden.^[66]

Die Rolle der Pro-Domäne als ein intramolekulares Chaperon wurde in Experimenten an verschiedenen Mitgliedern des CA-Clans durch ein Verkürzen des Propeptids nachgewiesen. In nahezu allen Fällen führte die vollständige Deletion oder bereits eine Verkürzung des Propeptids dazu, dass kein aktives Enzym produziert wurde, obwohl die katalytische Domäne vollständig translatiert wurde.^{[73][74][75]} Falcipain-2 aus *Plasmodium. falciparum* stellt die bislang einzig bekannte Ausnahme dar. Hier waren die C-terminalen 17 AS des Propeptids für die Faltung noch ausreichend.^[76] Zusätzlich zu der intramolekularen Chaperon-Funktion existieren Hinweise darauf, dass Mutationen innerhalb der Pro-Domäne die Substratspezifität der katalytischen Domäne beeinflussen können und dass dieser Effekt selbst nach Abspaltung der Pro-Domäne erhalten bleibt. Hinweise auf solch einen *memory*-Effekt konnten durch Mutationsstudien sowohl für Subtilisin als auch für Papain gefunden werden.^{[77][78]}

Die Funktion des Propeptids als intramolekularer Inhibitor wurde durch die Inkubation unterschiedlicher Proteasen der CathL-Familie mit ihrem Propeptid als separates Konstrukt untersucht.^{[79][80]} Die Affinität

des Propeptids für die katalytische Domäne lag meist im niedrigen nanomolaren Bereich und war pH sensitiv. Niedrigere pH-Werte, so wie sie im Lysosom vorkommen, führten zu einem Verlust der Affinität zwischen katalytischer Domäne und Pro-Domäne. Interessanterweise konnte das Cruzipain-Propeptid neben der *T. cruzi* CathL Protease auch andere Mitglieder der CathL Familie inhibieren, was auf die hohe Sequenzhomologie zwischen diesen Proteinen zurückgeführt wurde.^[81]

1.5 Struktur der Pro-Domänen in Cathepsin L-Zymogenen

Einige der in Kapitel 1.4 beschriebenen Eigenschaften der CathL-Pro-Domänen, wie beispielsweise ihre Inhibitorfunktion, gehen aus deren Struktur und Interaktion mit der katalytischen Domäne hervor. Dies konnte zuerst an der Röntgenkristallographiestruktur von Pro-Papain (PDB-ID.: 3TNX), einer CathL-Protease aus *C. papaya*, gezeigt werden (siehe Abbildung 8). In allen bislang bekannten Strukturen der CathL-Zymogene besteht die Pro-Domäne aus drei α -Helices und einem kurzen β -strand. Helix 1 und 2 sind durch einen *loop* miteinander verbunden und orthogonal zueinander ausgerichtet. Dies ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zu den verwandten CathB-ähnlichen Proteasen, denen die erste Helix fehlt. Helix 2 der CathL Pro-Domäne ist über ein kurzes Peptid mit Helix 3 verbunden, welches einen antiparallelen β -strand mit dem sogenannten *propeptide binding loop* (PBL) in der Core-Protease Domäne bildet. Helix 3 geht in einen ungefalteten Bereich über, der über dem *active site cleft* der Protease liegt und so den Zugang zum katalytischen Zentrum des Enzyms blockiert.

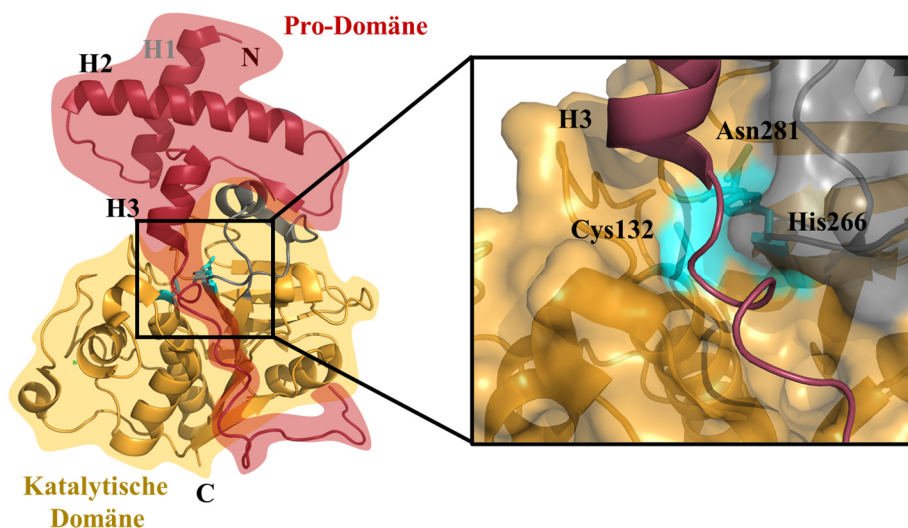


Abbildung 8: Charakteristische Strukturmerkmale und Orientierung der Pro-Domänen von CathL-ähnlichen Proteasen am Beispiel von Pro-Papain (PDB-ID.: 3TNX). Die Pro-Domäne ist in Rot, die katalytische Domäne in Orange, der propeptide binding loop (PBL) in Grau und die katalytische Triade in Cyan dargestellt. Die konservierten Sekundärstrukturen der CathL-Pro-Domänen sind mit H1 – 3 gekennzeichnet. Das Propeptid verläuft ausgehend von Helix 3 (H3) entlang des active site cleft über die katalytische Triade. Dieser Abschnitt ist in der Abbildung vergrößert dargestellt.

Die Pro-Domänen der CathL-ähnlichen Proteasen zeichnen sich zudem durch ein konserviertes Motiv innerhalb der Helix 2 aus, das ER(I/V)FNIN-Motiv, bestehend aus der Konsensussequenz (EX₃RX₂(I/V)(F/W)X₂NX₃IX₃N). Dieses Motiv ist auch in trypanosomalen CathL-Proteasen als leicht abgewandeltes ER(A/V)FNAA-Motiv mit der Sequenz EX₃RX₂(A/V)(F/W)X₂NX₃AX₃A zu finden (siehe Abbildung 9 A).^{[82][83][84]} Weiterhin besitzen CathL-Proteasen noch ein GNFD-Motiv (Konsensussequenz: G-X₁-N-X₁-F-X₁-D), im humanen Pro-Cathepsin L (A-X₁-N-X₁-F-X₁-D). Dieses befindet sich zwischen dem β -strand und der Helix 3 der Pro-Domäne (siehe Abbildung 9 B). Studien an Papain zeigten, dass diese hochkonservierte Sequenz entscheidend für die korrekte Faltung der Protease ist und dass nur wenige Mutationen in diesem Bereich toleriert werden.^[85]

Das ER(I/V)FNIN-Motiv der Helix 2 bildet ein Netzwerk aus Interaktionen zu anderen Bereichen der Pro-Domäne aus und nimmt somit ebenfalls eine entscheidende Rolle in der korrekten Faltung des Zymogens ein.^[86]

MD-Simulationen am Beispiel des humanen Pro-Cathepsin L (**hCathL**) legen nahe, dass es zu starken WW zwischen den Seitenketten des Glutamats ^{Pro}E38 und des Arginins ^{Pro}R42 innerhalb des **ER(I/V)FNIN**-Motivs kommt (siehe Abbildung 9).^[87] Zudem bildet das Arginin eine weitere ionische WW mit der Seitenkette eines Glutamats aus, das sich am N-Terminus der Helix 3 befindet. Die Interaktion des Arginins mit diesen beiden Glutamaten werden in den Kristallstrukturen der CathL-Zymogene häufig beobachtet und scheinen daher konserviert zu sein. In Mutagenesestudien führte der Verlust der Wechselwirkungen des Arginins in hCathL dazu, dass eine Aktivierung durch Einstellen eines sauren pH-Werts bei pH 4.5 geschah, während die Aktivierung des WT-hCathLs erst in einem saureren Milieu bei pH 4.0 beobachtet wurde.^[87] Eine Mutation des Glutamats innerhalb von Helix 3 zu Alanin führte bei Falcipain-3 hingegen dazu, dass nach Expression in *E. coli* und Rückfaltung keine Autoaktivierung beobachtet werden konnte.^[88] Daher scheinen die Interaktionen, welche zwischen dem Arginin und dem Glutamat innerhalb des **ER(I/V)FNIN**-Motivs sowie dem Glutamat der Helix 3 ausgebildet werden, eine entscheidende Rolle bei der Bildung aktiver Cathepsin L-Proteasen einzunehmen.

Zudem bildet das Phenylalanin bzw. das Tryptophan innerhalb der EX₃RX₂(I/V)(F/W)X₂NX₃IX₃N Sequenz einen π -Komplex mit den aromatischen Aminosäuren der Helix 1 aus (siehe Abbildung 9 C). Während der Expression von humanen **Cathepsin S (hCathS)**, welches ebenfalls ein Mitglied der CathL-Familie ist, wurde beobachtet, dass jeder Verlust einer dieser aromatischen AS bei Expression in HEK-293-Zellen zu einer Anreicherung des Zymogens im ER führte.^[89] Isolierte Pro-Domänen, welche ohne die katalytische Domäne exprimiert wurden, zeigten bei einem Verlust der aromatischen AS in Helix 1 oder dem ER(I/V)FNIN-Motivs in Tryptophanfluoreszenzmessungen eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums in den längerwelligeren Bereich.^[89] Dies deutet auf eine Umgebungsänderung der verbleibenden aromatischen Seitenketten durch den Verlust der hydrophoben π -WW und somit auf

eine Entfaltung der Pro-Domäne hin. Somit wurde die Anreicherung von CathS-Zymogen im ER auf nicht oder falsch gefalteten Pro-Domänen der Mutanten zurückgeführt.^[89]

Darüber hinaus bildet das C-terminale Asparagin des ER(I/V)FNIN-Motivs Wasserstoffbrücken mit dem Rückgrat des β -stands aus (siehe Abbildung 9 A).^[90]

Zusammenfassend wird die Pro-Domäne durch vielzählige Intra- und Interdomänen-Kontakte stabilisiert und hat demzufolge einen großen Einfluss auf die Faltung und Aktivierung der zugehörigen Proteasen.

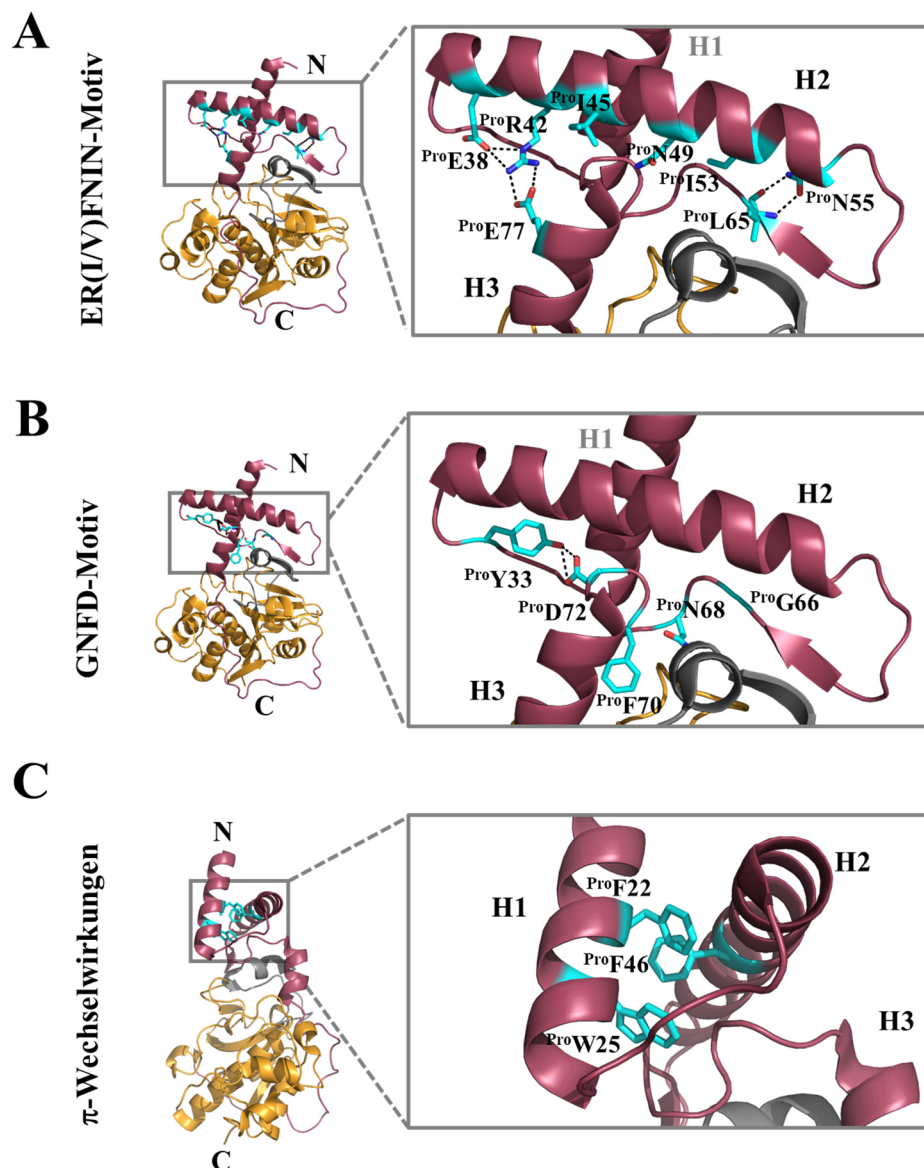


Abbildung 9: Typische Struktur motive der Cathepsin L-Zymogene am Beispiel der Kristallstruktur von Pro-Papain (PDB-ID.: 3TNX). Die Bereiche des ER(I/V)FNIN- und des GNFD-Motivs sind hervorgehoben. Die zugehörigen Aminosäuren sowie deren Interaktionspartner sind in Cyan dargestellt. Die katalytische Domäne ist in Orange, die Pro-Domäne in Rot dargestellt.

1.6 Substraterkennung und Hydrolysemechanismus der CathL-Proteasen

Die Hauptaufgabe der Cathepsine besteht im Abbau von Proteinen im Lysosom. Durch Abspaltung der Pro-Domäne von der katalytischen Domäne wird das aktive Zentrum freigegeben, in welchem die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysiert wird. Der Katalysemechanismus der Cysteinproteasen, wie z. B. von CathL oder Rhodesain, beruht auf einem nukleophilen Angriff des aktiven Cysteins am Carbonyl-C-Atom der Substrat-Peptidbindung. Dadurch wird diese Bindung gespalten und die Thiol-Gruppe acyliert (siehe Abbildung 10). Dies führt zur Freisetzung des C-terminalen Teils des Substrats als primäres Amin. Im anschließenden Schritt wird die Thiolgruppe durch den nukleophilen Angriff eines aktivierten Wassermoleküls deacyliert, wodurch der N-terminale Teil des Substrats als Carbonsäure freigesetzt wird und das Enzym in seinem ursprünglichen Zustand verlässt.^{[91][92]}

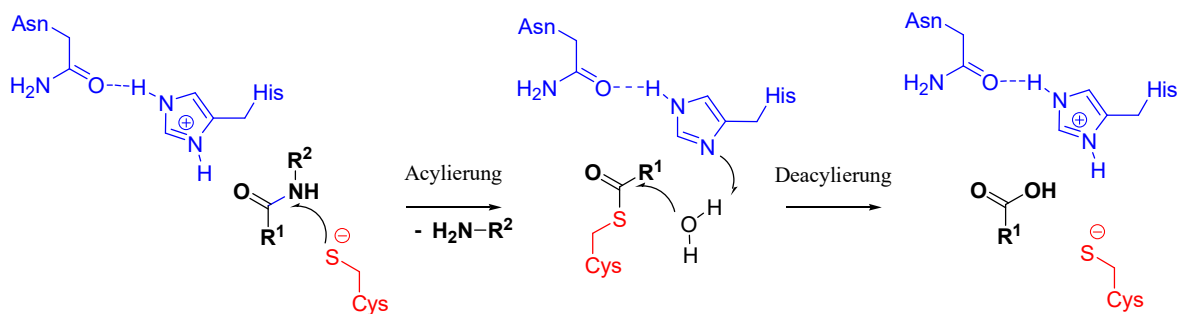


Abbildung 10: Reaktionsschritte der durch Cysteinproteasen katalysierten Peptidspaltung. Die Seitenkette des katalytischen Cysteins (Rot) greift nukleophil am Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung des Substrats (Schwarz) an. Dies führt zur Peptidspaltung, wobei das Cystein acyliert und der C-Terminus des Peptidsubstrats freigesetzt wird. Anschließend kommt es zur Hydrolyse der Thioester-Bindung durch ein Wassermolekül, welches durch die Histidin-Seitenkette (Blau) aktiviert wird. Nach der Hydrolyse verlässt der N-terminale Teil des Substrats das Enzym. Das katalytische Cystein liegt nach dieser Deacylierung erneut als Thiolat vor.

Die nötige Nukleophilie des aktiven Cysteins wird innerhalb des CA-Clans durch die Anwesenheit einer katalytischen Triade aus Cystein, Histidin und Asparagin gewährleistet. Dabei formen die Seitenketten des Cysteins und des Histidins ein Ionenpaar bestehend aus einem Thiolat- und einem Imidazolium-Ion.^[93] Die räumliche Nähe der beiden Seitenketten wird durch eine Wechselwirkung zwischen Asparagin und Histidin erzeugt, wodurch die nötige Orientierung der Histidin-Seitenkette fixiert wird.^[94] Weiterhin wird das Thiolat durch das Dipolmoment einer α -Helix, an dessen N-terminalen Ende es sich befindet, stabilisiert.^{[95][96]} Zudem führt während des Deacylierungsschrittes eine WW des katalytischen Histidins zu einer Polarisierung eines Wassermoleküls, wodurch der nukleophile Angriff des Wassers ermöglicht wird.^[96]

Das katalytische Zentrum von Proteasen befindet sich innerhalb des *active site clefts*. Dieser wird in Cathepsinen durch eine α -helikal-dominierte L- und eine β -sheet-dominierte R-Domäne geformt, welche V-förmig zueinander ausgerichtet sind (siehe Abbildung 11).^[97] Entlang des *active site clefts*

werden die Substratbindetaschen des Enzyms geformt, über die die Substraterkennung stattfindet. Die Selektion der Substrate geschieht nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Hierbei werden Peptidsequenzen gebunden, deren Seitenketten sich in Ladung und Form in die Substratbindetaschen einpassen.

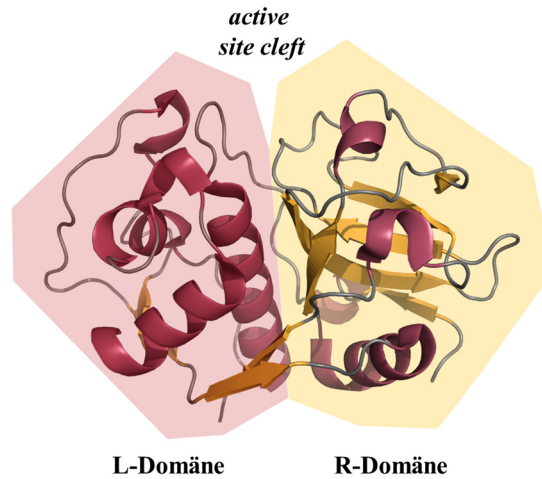


Abbildung 11: Aufteilung der katalytischen Domäne von CathL-Proteasen. Die Struktur lässt sich in eine α -helikal-dominierte L-Domäne (rot unterlegt) und eine β -sheet-dominierte R-Domäne (gelb unterlegt) aufteilen, welche V-förmig zueinander stehen und den active site cleft bilden.

Nach Berger und Schechter werden die Substratbindetaschen ausgehend von der Hydrolysestelle des Substrats fortlaufend nummeriert (S1 – Sn), wobei die Taschen auf der C-terminalen Seite des Substrats zusätzlich als *prime sites* (S1' – Sn') markiert werden (siehe Abbildung 12). Die Bezeichnung der AS, welche die entsprechenden Bindetaschen besetzen, erfolgt analog dazu (P1 – Pn und P1' – Pn').^[98] Diese Nomenklatur wird zudem verwendet um Bindemodi von Inhibitoren zu beschreiben.

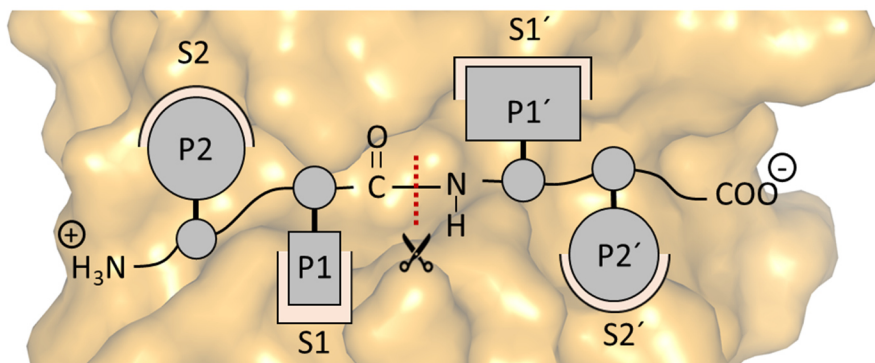


Abbildung 12: Nomenklatur der Substratseitenketten und deren Bindungsstellen in Proteasen nach Berger und Schechter.

Die Priorisierung unterschiedlicher Substrate durch die Bindetaschen wird in der Entwicklung peptidbasierter Proteaseinhibitoren genutzt, um selektiv bestimmte Enzyme zu adressieren. Ein Beispiel

hierfür ist die Bindung von K11777 an Rhodesain. Die Kristallstruktur des Rhodesain-K11777-Komplexes (PDB-ID.: 2P7U) zeigt deutlich wie die „Seitenketten“ des Inhibitors die Substratbindestellen S', S1, S2 und S3 des Enzyms besetzen (siehe Abbildung 13).

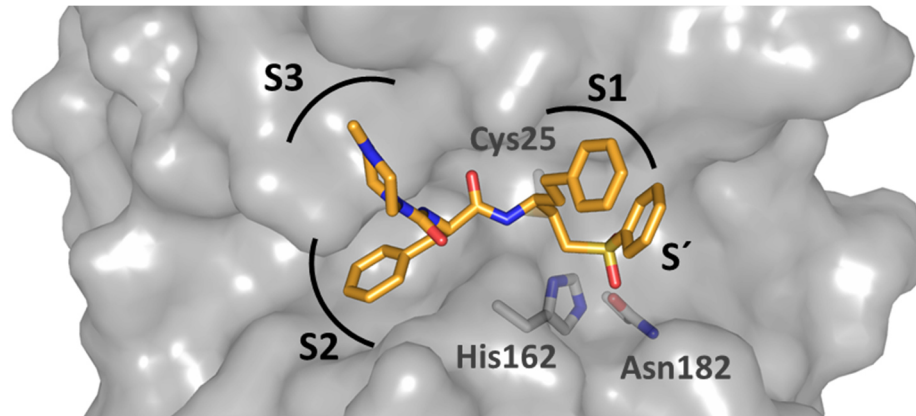


Abbildung 13: Ausschnitt der Kristallstruktur des Rhodesain-K11777-Komplexes (PDB-ID.: 2P7U). Die Substratbindetaschen, welche von den Seitenketten des peptidischen Inhibitorrückgrats eingenommen werden, sind eingezeichnet. Die Nummerierung der Aminosäuren der katalytischen Triade bezieht sich auf die Aminosäuresequenz der Kristallstruktur.

In Bezug auf Rhodesain ist die S2-Bindetasche hauptverantwortlich für die Substraterkennung und präferiert große hydrophobe Seitenketten wie die Phenylalaninseitenkette des K11777. Die S1-Tasche hingegen bevorzugt Arginin, toleriert jedoch auch Methionin oder die hPhe-Gruppe des Inhibitors. Im Gegensatz dazu wurden für die S3- und S'-Taschen keine Präferenzen publiziert, was sich durch ihre offene und schwach ausdefinierte Struktur erklären lässt.^{[99][100]}

Im Fall von Rhodesain wird eine selektive Adressierung allerdings durch die hohe Ähnlichkeit der katalytischen Domäne zu anderen Mitgliedern der CathL-Familie erschwert. So herrscht zwischen den katalytischen Domänen von Rhodesain und hCathL eine Sequenz-Identität von ca. 46% und eine Similarität von ca. 60% (siehe Abbildung 14). Die strukturelle Ähnlichkeit dieser beiden Enzyme spiegelt sich in dem niedrigen **C α -root-mean-square-deviation (C α -RMSD)**-Wert von 1.34 Å und nahezu identische Präferenzen für die jeweiligen Substratbindetaschen wider. Diese Übereinstimmung kann neben der gewünschten Inhibition der parasitären Protease auch zur gleichzeitigen Inhibition des humane Cathepsin Ls als *off-target* führen.

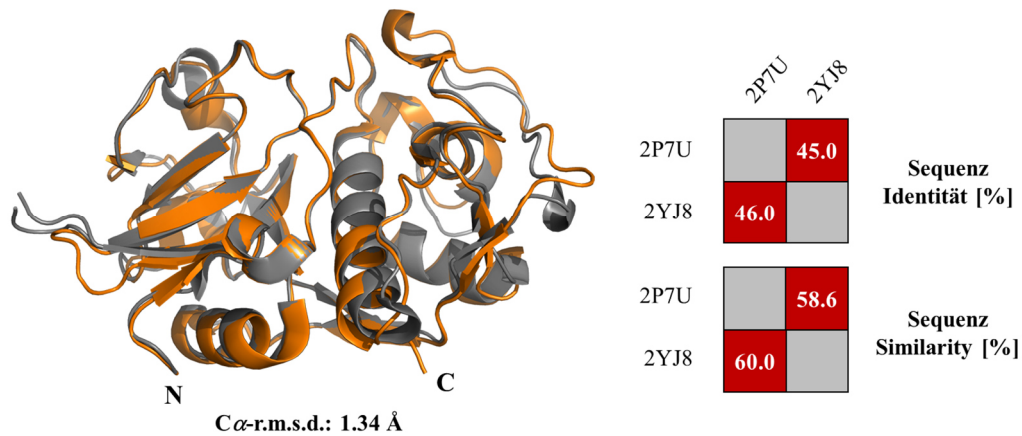


Abbildung 14: Überlagerung der Kristallstrukturen der katalytischen Domänen von Rhodesain (Orange, PBD-ID.: 2P7U) und humanen Cathepsin L (Grau, PBD-ID.: 2YJ8), sowie deren Sequenz-Identitäten und Similaritäten.

Dennoch können die geringen Unterschiede starke Auswirkungen auf die Eigenschaften der Proteasen haben. So weisen hCathL und Rhodesain Abweichungen bezüglich ihrer pH-abhängigen Aktivität auf, deren molekulare Ursachen jedoch nicht geklärt sind. Während humanes CathL bei neutralen bis basischen pH-Werten schnell irreversibel deaktiviert wird, konnte am Beispiel von Rhodesain und dessen Analogon aus *T. cruzi*, Cruzipain, gezeigt werden, dass die Aktivitäten der trypanosomalen Proteasen ein breiteres pH-Profil aufweisen.^{[101][102][103]}

Darüber hinaus konnten diese Unterschiede auch erfolgreich zur Optimierung der Selektivität von Inhibitoren genutzt werden (█).^[104] Dazu gehört beispielsweise das Einführen einer Methylgruppe an die 3- oder 4-Position des Phenylalanins des K11777-Peptidrückgrats, wodurch die Selektivität gegenüber der parasitären Protease um mehr als das 10fache gesteigert wurde.

1.7 Kovalente Inhibitoren

Kovalente Inhibitoren galten lange Zeit als unsicher, da sie Risiken durch unspezifische Reaktionen mit *off-targets* und das Auslösung von Immunantworten bergen.^[105] Zwar wurden bereits im 19. und im frühen 20. Jahrhundert die ersten kovalenten Wirkstoffe entwickelt, jedoch wurde ihr Mechanismus erst nach erfolgreicher Zulassung aufgeklärt. Mit Beginn des 21. Jahrhunderts rückten die Vorteile dieser Inhibitoren, wie eine im Vergleich zu nicht-kovalenten Liganden verlängerte oder unbegrenzte *residence time* an der Zielstruktur, verstärkt in den Vordergrund. Dies kann zu verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften der Inhibitoren/Wirkstoffe führen, was niedrigere Dosierungen ermöglicht.^{[106][107]} Aus diesem Grund erreichen zunehmend mehr kovalente Wirkstoffe die Marktreife (siehe Abbildung 15).

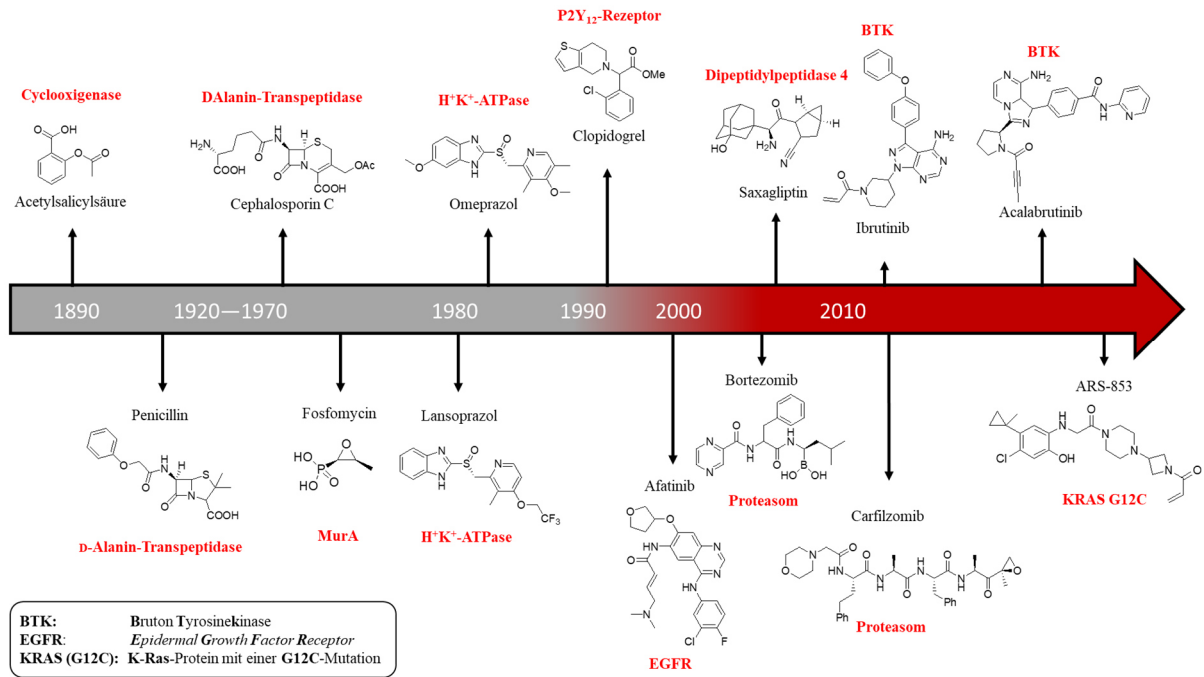


Abbildung 15: Zeitachse der Entwicklung kovalenter Inhibitoren. Die Rotfärbung der Achse impliziert die zunehmend gezielte Entwicklung von kovalent bindenden Liganden als potentielle Arzneistoffe.^{[108][109][110][111]} Die Strukturformeln sowie Namen einiger Wirkstoffe sind in Schwarz und ihre zugehörigen targets in Rot angegeben.

Strukturell bestehen kovalente Wirkstoffe aus einer Erkennungseinheit, die für die Bindung an das korrekte *target* verantwortlich ist, und einer reaktiven Gruppe (*warhead*), welche die kovalente Reaktion einght. Somit können Inhibitoren durch das Einführen kovalent reagierender *warheads* auch gegen *targets* designt werden, die auf Grund einer mangelhaft ausgeprägten Bindetasche für nicht-kovalente Inhibitoren als *undruggable* gelten.^[112] Die Risiken der *off-target*-Reaktionen können durch gezielte Optimierung der Wirkstoff-Strukturen reduziert werden. Im Falle der Proteaseinhibitoren bestehen die Wirkstoffe meist aus einem peptidischen Rückgrat, welches das natürliche Substrat imitiert, und einem elektrophilen *warhead*, welcher mit den nukleophilen Gruppen im aktiven Zentrum reagiert.

Tabelle 6: Reaktive Gruppen, welche als warheads für die Adressierung von Cystein-Seitenketten verwendet werden. Die reaktiven Gruppen wurden hinsichtlich ihrer Selektivität gegenüber Cystein-Seitenketten eingeteilt. Nicht-selektive warheads gehen ebenfalls Reaktionen mit anderen nukleophilen Gruppen, wie z. B. Serin-Seitenketten ein.

		Reaktionsmechanismus	Reversibilität
Geringe Selektivität gegenüber aktivierten Cysteinen		<p style="text-align: center;">Halomethylketone</p>	Irreversibel ^[113]
		<p style="text-align: center;">Diazomethane</p>	Irreversibel ^[114]
		<p style="text-align: center;">Epoxide</p>	Irreversibel ^[115]
		<p style="text-align: center;">Aldehyde</p>	Reversibel ^[116]
		<p style="text-align: center;">Semicarbazone</p>	Reversibel ^[117]
Hohe Selektivität gegenüber aktivierten Cysteinen		<p style="text-align: center;">Nitrile</p>	Reversibel ^[118]
		<p style="text-align: center;">Acrylamide</p>	Irreversibel
		<p style="text-align: center;">Michael-Akzeptoren</p>	Irreversibel ^[119]

Es existieren zahlreiche *warheads*, die Cystein-Seitenketten adressieren. Diese zeigen jedoch deutliche Unterschiede in Bezug auf Selektivität, Reaktivität und Reversibilität (Tabelle 6). Unspezifische *warheads*, die auch mit nicht aktivierten Cysteinen oder anderen nukleophilen Gruppen reagieren, erhöhen das Risiko von *off-target*-Effekten. Die dadurch möglicherweise ausgelösten Nebenwirkungen können zusätzlich verstärkt werden, wenn die Bindung an ein *off-target* irreversibel ist.

Ob ein Ligand reversibel oder irreversibel mit einem *target* reagiert, hängt im Wesentlichen vom Energieprofil der Reaktion ab. Wie in Abbildung 16 vereinfacht dargestellt, verläuft die Bindung eines kovalenten Liganden nach einem Mechanismus, welcher in mindestens zwei Schritte eingeteilt werden kann. Während des ersten, nicht-kovalenten Schritts kommt es zur Interaktion des Liganden mit der Bindetasche des Proteins. Die Stabilität dieses zunächst nicht-kovalenten Komplexes ($E \cdots I$) ist abhängig von der Energiebarriere, die zum Auflösen der Enzym-Inhibitor-Bindung notwendig ist, und ergibt sich aus der Summe ΔG_b^0 (Energiedifferenz zwischen nicht-gebundenem Zustand und dem nicht-kovalenten Komplex) und ΔG_b^* (Aktivierungsenergie der Komplexbildung).

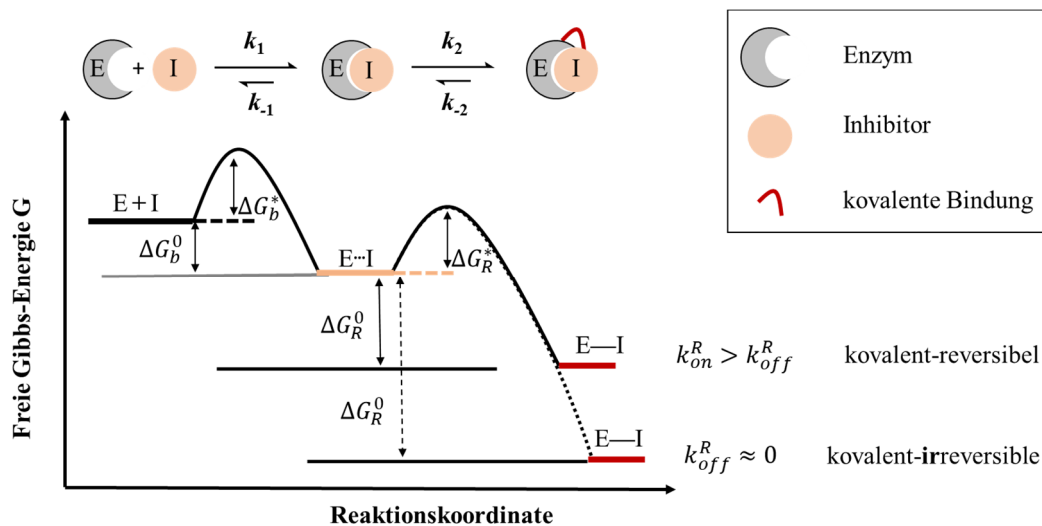


Abbildung 16: Theoretisches Energieprofil der Bindung eines kovalent (ir)reversiblen Inhibitors an eine Zielstruktur in einem vereinfachten zweistufigen Mechanismus.

Der zweite Schritt beschreibt die kovalente Reaktion des *targets* mit dem Liganden. Die Stabilität des kovalenten Zustands ($E-I$) ist wie bei einem nicht-kovalenten Komplex abhängig von der Energiebarriere der Rückreaktion. Diese ergibt sich aus der Summe ΔG_R^0 (Energiedifferenz des nicht-kovalenten Komplexes und des kovalenten Komplexes) und ΔG_R^* (Aktivierungsenergie der kovalenten Reaktion). Je exergoner die Bildung des kovalenten Komplexes somit ist, desto höher ist die Energiebarriere für die Rückreaktion. Somit kann bei einer ausreichend hohen Energiedifferenz zwischen dem ($E \cdots I$)- und dem ($E-I$)-Zustand eine Bindung unter physiologischen Bedingungen praktisch nicht mehr gebrochen werden. Durch Derivatisierungen von kovalent-irreversibel bindenden

warheads kann jedoch die Energiedifferenz ΔG_R^0 dahingehend beeinflusst werden, dass eine Rückreaktion ermöglicht wird.^{[120][121][122]} Solche kovalent-reversiblen Liganden teilen die Vorteile kovalent-irreversibler Inhibitoren (z. B. eine längere *residence time* am *target*) ohne gleichzeitig die Risiken der unbeabsichtigten Zerstörung von *off-target*-Strukturen zu tragen.

Die Wechselwirkung eines Liganden mit einem Rezeptor kann anhand unterschiedlicher Konstanten beschrieben werden. Eine der häufigsten Konstanten ist der K_D -Wert, welcher sich im einfachsten Fall aus der folgenden Formel (1) ergibt:

$$K_D = \frac{[E][I]}{[E - I]} \quad (1)$$

wobei $[E]$ der Konzentration des freien Rezeptors oder Enzyms, $[I]$ der Konzentration des freien Liganden oder Inhibitors und $[E - I]$ der Konzentration des Enzym-Inhibitor- bzw. Rezeptor-Ligand-Komplexes entsprechen. $[E - I]$ umfasst dabei sowohl kovalent-reversible als auch nicht-kovalente Enzym-Inhibitor-Komplexe.

Unter der Voraussetzung, dass sich die freie Ligandenkonzentration durch die Bindung an den Rezeptor nicht maßgeblich ändert, entspricht der K_D -Wert der Ligandenkonzentration, bei welcher 50% des Rezeptors gebunden wurden. Alternativ dazu werden in der Literatur häufig der IC_{50} und der K_i -Wert angegeben, wobei ersterer die Inhibitorkonzentration angibt, bei welcher die halbmaximale Inhibition erreicht wird. Da dieser Wert abhängig von der verwendeten Substratkonzentration ist, wird anstelle des IC_{50} der Substrat-unabhängige K_i -Wert angegeben, welcher sich für kompetitive Inhibitoren aus der Cheng-Prusoff-Gleichung (2) ergibt:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_M}} \quad (2)$$

Dabei entspricht $[S]$ der Substratkonzentration und K_M der Michaelis-Menten-Konstante des verwendeten Substrats.^[123]

Diese Konstanten werden häufig genutzt, um das Potential eines Wirkstoffs zu beschreiben, da sie einen Eindruck vermitteln, wie „fest“ ein Ligand an die Zielstruktur bindet. Daher werden potenzielle Wirkstoffe oftmals anhand dieser Werte beurteilt und optimiert. Ein großer Nachteil dieser Beurteilung besteht jedoch darin, dass sie einen künstlichen Gleichgewichtszustand beschreibt, welcher unter physiologischen Bedingungen nicht existiert. Grund dafür ist, dass sich die Konzentration von Wirkstoffen im Körper durch Metabolisierung und Ausscheidung stetig ändert. Daher vermittelt die *residence time* – die Zeit, die ein Ligand am Rezeptor verweilt – eine bessere Einschätzung über die Effizienz eines bestimmten Wirkstoffs. Diese lässt sich in *in vitro*-Experimenten am besten durch die kinetischen Parameter k_{on} (Assoziationsrate) und k_{off} (Dissoziationsrate) beurteilen. Trotz ihrer Bedeutung werden diese Werte bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe jedoch häufig vernachlässigt.^{[106][107]}

1.8 Aptamere als Therapeutika

Der Begriff Aptamer (lat.: *aptus* = passend) beschreibt einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle, die durch ihre definierte Tertiärstruktur Moleküle mit hoher Affinität binden können.^[124] Eine Klasse natürlicher Aptamere bilden die Riboswitches. Diese bestehen aus einem mRNA-Strang, welcher zusammen mit einem regulierenden Aptamer-Element transkribiert wird. Durch Bindung eines Metaboliten an dieses Element kann eine Strukturänderung induziert werden, wodurch das Ablesen der mRNA ermöglicht oder verhindert wird.^[125] Das Aptamer-Element wirkt somit wie ein An- oder Ausschalter für Translationsprozesse.

Durch ihre Fähigkeit an unterschiedlichste Zielstrukturen binden zu können, werden Aptamere als Alternative zu Antikörpern angesehen, weshalb sie ähnliche Anwendungen finden. Diese reichen von *drug delivery*-Systemen über Diagnostik bis hin zur direkten Anwendung als Wirkstoffe, beispielsweise als Rezeptorantagonisten oder Enzyminhibitoren.^{[126][127][128][129]}

Die Vorteile der Aptamere bestehen dabei in ihrer hohen Stabilität gegenüber Salzkonzentrations- und Temperaturschwankungen, sowie einer geringen Toxizität und immunogenem Potential. Zudem besitzen Aptamere in der Regel ein kleineres Molekulargewicht als Antikörper, was es ihnen in einigen Fällen ermöglicht, die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren.^{[130][131]}

Das kleinere Molekulargewicht der Aptamere hat jedoch auch den Nachteil einer schnelleren renalen Ausscheidung, weshalb sie häufig mit **Polyethylenglycol (PEG)** modifiziert werden. Die damit verringerte renale *clearance* birgt jedoch das Risiko eines Affinitätsverlusts.^{[131][132]} Zudem sind vor allem RNA-Aptamere anfällig gegenüber Nukleasen, wodurch ihre Halbwertszeit unter physiologischen Bedingungen oft nur einige Minuten beträgt. Die Stabilität lässt sich jedoch ebenfalls durch unterschiedliche Modifikationen deutlich erhöhen.

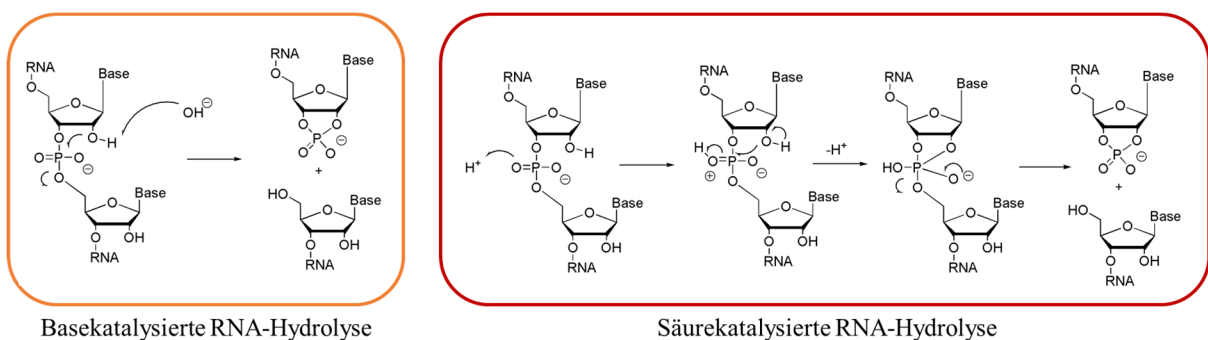


Abbildung 17: Reaktionsmechanismen der Säure- und Base-katalysierten Hydrolyse des RNA-Rückgrats.

Diese Modifikationen können entweder an den Termini des Oligomers durch *capping*-Methoden oder Substitutionen des Ribose- bzw. des Phosphatrückgrats vorgenommen werden.^[133] Klassische 3'-

Modifikationen sind Brückenbildung zwischen dem C2- und dem C4-Atom der terminalen Ribose oder das *capping* durch ein invertiertes Thyminid.^{[134][135]} Die häufigsten Modifikationen des Riboserückgrats finden durch Substitution der 2'-Hydroxygruppe durch Fluor- Amino- oder Methoxygruppen statt. Diese bietet neben einem verminderten Abbau durch Nukleasen auch den Vorteil, dass die RNA unempfindlicher gegenüber basischen und sauren pH-Werten wird, welche einen intramolekularen Ringschluss und damit eine Spaltung der Kette katalysieren können (Abbildung 17).^{[136][137][138]} Eine weitere Methode, um dies zu verhindern, ist der Austausch des Phosphatrückgrats gegen Phosphorothionate, Methylphosphonate oder Triazole (siehe Abbildung 18).

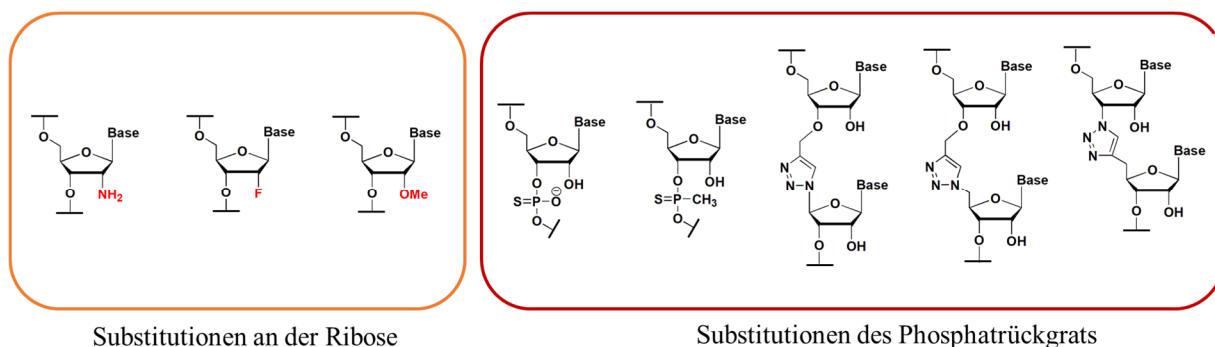


Abbildung 18: Beispiele von Derivatisierungen, welche zur Stabilisierung der RNA gegenüber Degradation eingesetzt werden.

Ein Beispiel zur klinischen Anwendung von RNA-Aptameren, ist der Wirkstoff Pegaptanib, der unter dem Handelsnamen *Macugen* seit 2006 zur Behandlung von altersabhängiger Makuladegeneration zugelassen wurde.^[139] Wie in der Struktur des Wirkstoffs zu erkennen ist (Abbildung 19), wurden viele der vorgestellten Aptamer-Modifikationen zur Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften angewandt. Diese umfassen ein 3'-*capping* mit einem invertierten Thyminid, Substitutionen der 2'-Hydroxygruppen und eine Erhöhung des Molekulargewichts durch Anhängen eines PEGylierten Substituenten.

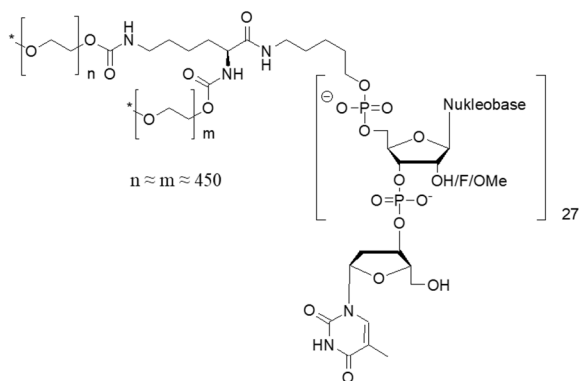


Abbildung 19: Strukturformel von Pegaptanib.

Eine Methode zur Identifikation neuer relevanter Aptamer-Sequenzen ist der *selective evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)*-Ansatz (siehe Abbildung 20). Dabei wird das gewünschte *target* mit einer RNA- oder DNA-Bibliothek versetzt und nicht-bindende Oligonukleotide durch einen Waschschrift entfernt. Die verbliebenen DNA- oder RNA-Moleküle werden vom *target* eluiert und mittels *polymerase chain reaction (PCR)* oder *reverse transcription (RT)*-PCR amplifiziert, bevor der Zyklus mit dem nun angereicherten DNA-/RNA-Pool wiederholt wird. Indem dieser Zyklus 5 – 15 Mal durchlaufen wird, werden Oligomere erhalten, deren Affinität zum *target* sich im nieder-nanomolaren bis picomolaren Bereich befindet.^[140]

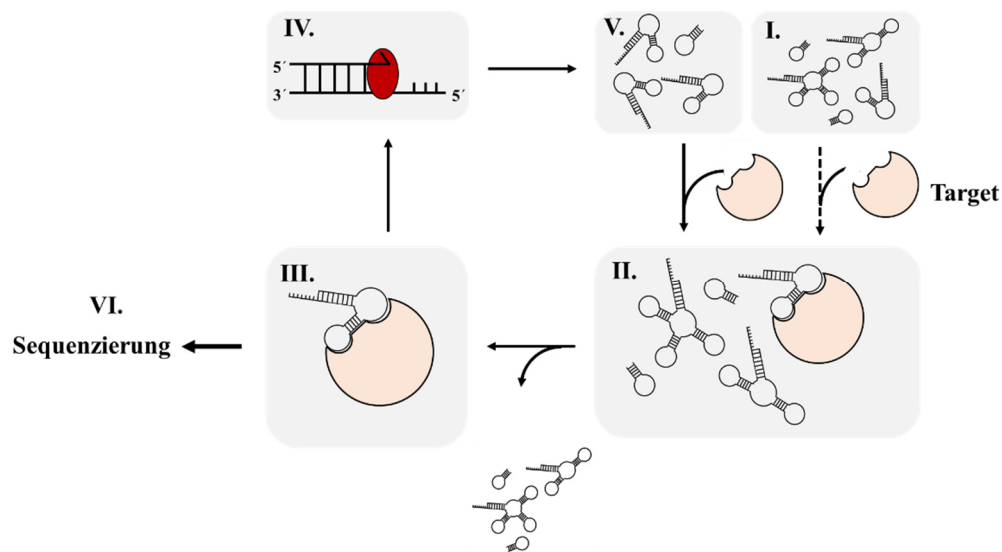


Abbildung 20: Schematische Darstellung des SELEX-Zyklus. (I.) Eine DNA- oder RNA-Bibliothek wird mit dem gewünschten target inkubiert, sodass es (II.) zur Bindung einiger Moleküle an die target-Struktur kommt. Durch einen Waschschrift werden schwach- oder nicht-bindende Moleküle entfernt, wodurch (III.) affinere Liganden angereichert werden. (IV.) Diese werden durch Denaturierung freigesetzt und in einem (RT-)PCR-Schritt amplifiziert. (V.) Der neue Pool an Oligonukleotiden wird erneut mit dem target versetzt und der Zyklus wiederholt. (VI.) Nach 5 – 15 Durchläufen werden angereicherte Sequenzen analysiert.

Durch diesen SELEX-Ansatz wurde ein RNA-Aptamer (Aptamer 2-16) identifiziert, welches an ein 42 kDa Protein innerhalb der flagellaren Tasche von *T. brucei* bindet und anschließend endozytiert wird.^{[141][142]} Aufgrund des Molekulargewichts des Rezeptors und der Translokation in das Lysosom des Parasiten wurde geschlossen, dass es sich bei dem Bindungspartner des Aptamers um eine Untereinheit des trypanosomalen Transferrin-Rezeptors handeln könnte.^{[142][141]} Weitere Studien, in denen das Aptamer mit dem Oligopeptid GALA modifiziert wurde, zeigten, dass das Aptamer 2-16 als *drug delivery*-System für trypanozide Substanzen genutzt werden kann. Bei GALA handelt es sich um ein synthetisches Peptid (Seq. = ^+H_3N -WEAALAEALAEALAEHLAE-ALAEALEALAA-COO $^-$), welches unter basischen bis neutralen Bedingungen unstrukturiert vorliegt und in saurer Umgebung eine α -Helix ausbildet. Durch die Zusammenlagerung mehrerer α -helikaler GALA-Monomere kann es zur Transmembran-Porenbildung und damit zu einem lytischen Effekt der sauren Lysosomen kommen.^[143]

Eine gesteigerte Serumstabilität des Aptamers 2-16 wurde durch die Einführung von 2'-*F*-modifizierten 2'-Desoxypyrimidinnukleosiden erzielt. Dies führte zu einer Erhöhung der Halbwertszeit von < 5 min auf 3.4 T in humanem Serum. Zudem resultierte die eingeführte Modifikation nicht in drastischem Affinitäts- ($K_{D, \text{unmod.}} = 10 \text{ nM}$, $K_{D, 2'-F\text{-mod.}} = 45 \text{ nM}$) oder Selektivitätsverlust bezüglich des Bindungsverhaltens an der flagellaren Tasche.^[144]

Durch die Konjugation von Rhodesain- und CathL-Inhibitoren an dieses Aptamer könnte somit ein neuer Ansatz für die trypanosomenspezifische Adressierung erreicht werden, welcher das Risiko von *off-target*-Effekten und die damit verbundene Toxizität solcher Verbindungen minimiert.

2 Zielsetzung und Motivation

Rhodesain ist die Hauptcysteinprotease von *T. b. rhodesiense*, einem Erreger der *Human African Trypanosomiasis (HAT)* bzw. der ostafrikanischen Schlafkrankheit. Da dieses Enzym für den trypanosomalen Parasiten essenziell ist, stellt es ein vielversprechendes *target* zur Behandlung der HAT dar. Aufgrund dieser Relevanz ist Rhodesain von großem wissenschaftlichem Interesse und jede Erkenntnis über die Protease könnte zu der Entwicklung neuer Therapieansätze der Schlafkrankheit beitragen.

Diese Arbeit soll dazu dienen, ein tieferes Verständnis der Cysteineprotease Rhodesain selbst und ihrer Interaktionen mit Inhibitoren als eine Basis für die Entwicklung und Optimierung neuartiger Inhibitoren zu schaffen.

In vorangegangenen Arbeiten wurde die Elektrophilie der *warheads* Vinylsulfon-basierter Inhibitoren durch gezielte Derivatisierung optimiert, sodass die dabei erhaltenen α -Fluoro-Vinylsulfone Cysteinproteasen über einen kovalent-reversiblen Mechanismus inhibieren.^{[104][145]} Die bereits bekannten Eigenschaften bezüglich der Reversibilitäten und Affinitäten der Rhodesain- α -Fluoro-VS-Bindungen sollen um eine weitere Charakterisierung hinsichtlich der Thermodynamik, Kinetik und Dynamik ergänzt werden.

In Kooperation mit [REDACTED] soll ein Protokoll zur heterologen Expression von Rhodesain in *E. coli* erstellt werden, das die Generierung von Mutanten ermöglicht, welche zur spezifischen Aufklärung verschiedenster biophysikalischer und biochemischer Eigenschaften von Rhodesain selbst und dessen Inhibitoren genutzt werden können.

Diese Mutanten sollen in Kooperation mit [REDACTED] insbesondere zur Aufklärung der Struktur von Pro-Rhodesain, dessen Aktivierungsmechanismus und zur Analyse der Bindung zwischen Rhodesain und (α -Fluoro-)VS mittels unterschiedlicher Methoden wie ITC, SPR oder PET-FCS genutzt werden.

Die Ziele dieser Arbeit sind somit erstens neue Erkenntnisse über die Protease zu erlangen und zweitens Strategien zu entwickeln und Methoden zu etablieren, um die Rhodesain-Inhibitor-Bindungen genauer zu charakterisieren. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand zudem darin ein *drug-delivery*-System aus einem RNA-Aptamer und Vinylsulfonen zu synthetisieren, durch welches Zell- und Organell-spezifisch das Lysosom der Trypanosomen, in welchem sich die Zielstruktur Rhodesain befindet, adressiert wird. Durch diesen Ansatz sollen mögliche Nebenwirkungen der Inhibitoren minimiert und deren trypanozide Wirkung optimiert werden.

3 Strukturanalyse und Charakterisierung von (Pro-)Rhodesain

Die Cysteinprotease Rhodesain des Parasiten *T. b. rhodesiense* ist aufgrund ihrer Beteiligung an zahlreichen humanpathogenen Vorgängen sowohl aus medizinischer als auch aus biochemischer Perspektive bedeutsam.

Während der Reifung von inaktivem Pro-Rhodesain zu aktiven *mature* Rhodesain stellt die Abspaltung der Pro-Domäne einen entscheidenden Schritt in der Aktivierung der Protease dar. Zur Untersuchung dieses Prozesses wurde zunächst eine Methode zur heterologen Expression von Rhodesain aus *Escherichia coli* (*E. coli*) entwickelt (3.1) und das isolierte Protein zur Strukturaufklärung des Zymogens verwendet (3.2). Darüber hinaus wurden sowohl biochemische/-physikalische als auch computergestützte Methoden angewandt, um die Aktivierung von Pro-Rhodesain zu untersuchen (3.3).

3.1 Heterologe Expression von Rhodesain

Eine Grundvoraussetzung zur *in vitro*-Charakterisierung von Rhodesain ist dessen Isolierung und Aufreinigung. Die Expression von Rhodesain kann entweder homolog in seinem ursprünglichen Organismus (*T. b. rhodesiense*) oder heterolog in anderen Organismen (wie z.B. *P. pastoris* oder *E. coli*) erfolgen. Obwohl die heterologe Expression Vorteile wie eine gezielte Induzierbarkeit der Proteinsynthese, eine bessere Kultivierbarkeit der Organismen und ein geringeres Sicherheitsrisiko als das Arbeiten mit *T. b. rhodesiense* bietet, ergeben sich dabei jedoch einige Herausforderungen. Zu diesen zählt, dass der Expressionsapparat der verwendeten Zellen von dem der *T. b. rhodesiense* abweicht, wodurch es zu Unterschieden in der Modifikation und der Faltung von Rhodesain kommen kann.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden ein eu- und ein prokaryotisches Expressionssystem verwendet; die Hefe *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) und das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*). Dabei unterscheiden sich alle Rhodesain-Konstrukte aus *E. coli* und *P. pastoris* von dem aus *T. brucei* durch eine Punktmutation (S277A), durch die eine O-Glykosylierungsstelle entfernt wurde. Darüber hinaus fehlt den Konstrukten die trypanosomentypische C-terminale Domäne (Tre343 – Gln430), deren Funktion bislang nicht bekannt ist, die aber nachweislich keine Rolle für die Faltung und Aktivität von Rhodesain spielt.^[101] Dennoch wurde dieses Konstrukt als *wild type* (WT) bezeichnet, sofern keine weiteren Mutationen vorgenommen wurden.

Für die eukaryotische heterologe Expression wurde der Hefestamm *P. pastoris* X33 verwendet, aus welchem Rhodesain erfolgreich aufgereinigt werden konnte.

Ergänzend dazu wurde im Verlauf dieser Arbeit ein Protokoll für die prokaryotische heterologe Expression und anschließende Reinigung von Rhodesain aus *E. coli* entwickelt.

3.1.1 Expression und Reinigung von Rhodesain in *Pichia pastoris*

Der Hefestamm *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) ist ein etabliertes Expressionssystem, das die Vorteile einer leichten Kultivierbarkeit und eines eukaryotischen Expressionsapparats bietet, weshalb er besonders für die Gewinnung von eukaryotischen Proteinen geeignet ist.

Der in dieser Arbeit verwendete Klon wurde während der Dissertation von [REDACTED] durch das Einklonieren einer Rhodesain-kodierenden Sequenz *downstream* zum Alkohol-Oxidase-Promotor 1 (AOX1) generiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.^[146] Die Expression wurde durch Überführen der *P. pastoris*-Zellen in ein Minimalmedium mit Methanol als einzige Kohlenstoffquelle induziert. Das Rhodesain-Konstrukt bestand aus einer N-terminalen Sekretionssequenz des α -mating factors (das α -mating-factor secretion signal (α -MFSS)), gefolgt von einer *Kex2*-Hydrolyse-Stelle und dem Pro-Enzym (siehe Abbildung 21 A).

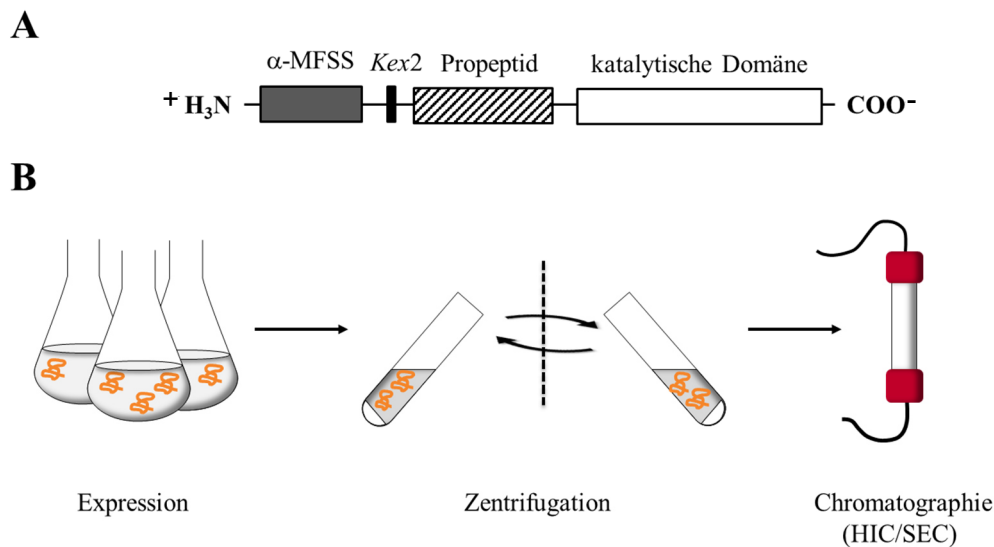


Abbildung 21: Heterologe Expression von Rhodesain in *P. pastoris*. (A) Schematischer Aufbau des Rhodesain-Konstrukts zur heterologen Expression aus *P. pastoris*. Das N-terminale α -mating-factor secretion signal (α -MFSS) führt zur Sekretion des Enzyms ins Expressionsmedium. Die Abspaltung der Signalsequenz erfolgt an der *Kex2*-Protease-Erkennungssequenz (*Kex2*) durch die entsprechende *Kex2*-Protease im Golgi-Netzwerk der *P. pastoris*. (B) Schematische Darstellung der Expressions- und Reinigungsschritte für Rhodesain aus *P. pastoris*.

Durch die Sekretionssequenz erfolgt die Expression des Enzyms zunächst in das endoplasmatische Retikulum der Hefen, von wo aus es in den Golgi-Apparat transportiert und schließlich in das Medium sekretiert wird. Die Abspaltung des α -MFSS erfolgt dabei im mittleren Golgi-Apparat der *P. pastoris* durch die *Kex2*-Protease.^[147]

Das sekretierte Rhodesain konnte durch Zentrifugation von den Zellen abgetrennt und über eine *hydrophobic interaction chromatography* (HIC)-Säule aufkonzentriert werden. Als finaler

Aufreinigungsschritt erfolgte eine *size exclusion chromatography* (SEC; siehe Abbildung 22 B). Durch dieses Expressionssystem wurde ausschließlich WT-Rhodesain in der aktiven, reifen Form gewonnen.

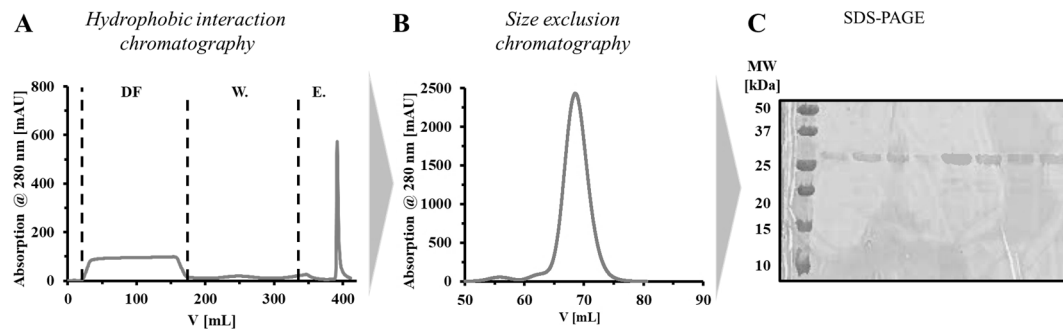


Abbildung 22: Aufreinigung von Rhodesain aus *P. pastoris*. (A) Chromatogramm der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) mit Durchfluss- (DF), Wasch- (W.) und Elutionsfraktion (E.). Die Elutionsfraktion wurde durch size exclusion chromatography (SEC) weiter aufgereinigt. (B) Ausschnitt eines SEC-Chromatogramms. (C) 15%ige SDS-PAGE-Gel des Elutionspeaks der SEC.

3.1.2 Isotopen-Markierung von Rhodesain für NMR Studien

Nuclear magnetic resonance (NMR)-basierte Studien an Rhodesain ermöglichen es das Verhalten des Proteins unter verschiedenen Bedingungen in Lösung zu beobachten. Aus diesen Experimenten können zum Beispiel Erkenntnisse über die Dynamik des gesamten Enzyms und einzelner Aminosäuren (AS) bzw. Atome in An- und Abwesenheit von Inhibitoren gewonnen werden.

Um NMR-basierte Studien an Rhodesain durchführen zu können, wurde ein Protokoll etabliert, welches einen uniformen Einbau von ^{13}C - und/oder ^{15}N -Isotopen in das Protein ermöglichte. Diese Isotope weisen einen Kernspin von $I = \frac{1}{2}$ auf und sind somit, im Gegensatz zu ^{12}C und ^{14}N , NMR-aktiv.

Zur Markierung von Rhodesain mit ^{15}N wurde *P. pastoris* in einem Minimalmedium, welches $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ als einzige Stickstoffquelle enthielt, kultiviert. Als Kohlenstoffquelle für die Vorkultur diente dabei Glycerol und die Induktion der Proteinexpression wurde mit Methanol induziert. Für das gleichzeitige Markieren mit ^{15}N - und ^{13}C -Isotopen wurden ^{13}C -Glucose anstelle von Glycerol verwendet und die Proteinexpression mit ^{13}C -Methanol induziert. Durch dieses Protokoll konnte uniform markiertes (^{13}C)/ ^{15}N -Rhodesain erhalten werden.

Ursprünglich sollten die Resonanzen in den NMR-Messungen den jeweiligen Atomen des Rhodesain Rückgrats zugeordnet werden. Dies sollte es ermöglichen, Konformations- und Umgebungsänderungen einzelner AS oder des gesamten Enzyms durch die Bindung von Liganden oder durch andere Einflüsse in Lösung zu verfolgen. Obwohl ein solches *assignment* aufgrund unzureichender Relaxationseigenschaften nicht erstellt werden konnte, konnte das Protokoll in Kooperation mit [REDACTED] genutzt werden, um die Interaktion von peptidbasierten Inhibitoren mit Nitroalken-warheads mit ^{15}N -markierten

Rhodesain zu untersuchen.^[122] Dazu wurden ^1H - ^{15}N -*transverse relaxation optimized spectroscopy-heteronuclear single quantum coherence* (TROSY-HSQC)-Spektren des ^{15}N -isotopenmarkierten Enzyms sowohl in An- als auch in Abwesenheit des Inhibitors gemessen (siehe Abbildung 23).

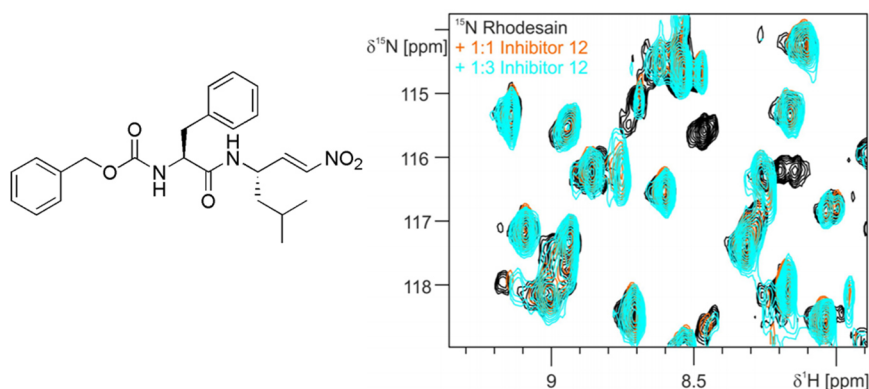


Abbildung 23: NMR-basierte Studie der Bindung eines Nitroalken-basierten Inhibitors an Rhodesain. ([links](#)) Nitroalken-basierter Inhibitor. ([rechts](#)) Ausschnitt der Überlagerung von ^1H - ^{15}N -TROSY-HSQC-Spektren von Rhodesain in Abwesenheit des Inhibitors (Schwarz) sowie bei einem molaren Verhältnis von Rhodesain : Nitroalken = 1 : 1 (Orange) und 1 : 3 (Cyan). (Diese Abbildung wurde mit Genehmigung aus ACS Med. Chem. Lett. **2016**, 7, 1073–1076 entnommen).^[122]

Durch die Zugabe des Liganden kam es zu Linienverbreiterungen oder Verschiebungen der Signale. Dabei konnte bereits bei einem molaren Verhältnis von 1 : 1 (Ligand : Enzym) eine Sättigung beobachtet werden, was in Übereinstimmung mit dem niedrigen nanomolaren K_i -Wert des Inhibitors ($K_i = 6.5 \text{ nM}$) steht. Insgesamt waren nur wenige Resonanzen von der Inhibitorzugabe betroffen, was weiterhin dafürspricht, dass die Bindung des Liganden an Rhodesain nur zu geringen Strukturänderungen des Enzyms führt.

3.1.3 Etablierung eines Expressions- und Reinigungsprotokolls von Rhodesain aus *E. coli*

Die Expression von Rhodesain in *E. coli* bietet den Vorteil, dass gewünschte Mutationen schneller in das Rhodesain-Konstrukt eingeführt werden können als bei anderen Expressionssystemen, wie beispielsweise *P. pastoris*. Grund dafür ist, dass *E. coli*-Zellen nach der Transformation mit den entsprechenden Plasmiden direkt zur Proteinsynthese verwendet werden können. Im Gegensatz dazu müssen transformierte *P. pastoris*-Zellen mehrfach selektiert werden, bis ein geeigneter Klon isoliert wird. Allerdings besitzen *E. coli*-Zellen keinen eukaryotischen Expressionsapparat, weshalb die heterologe Expression von eukaryotischen Proteinen häufig zu Löslichkeits- oder Faltungsproblemen führt. Dieses Problem ist für Rhodesain und verwandte Proteasen literaturbekannt.^[101] Durch die Verwendung geeigneter *E. coli*-Stämme, Expressionsbedingungen oder chimärischer Proteinkonstrukte

können diese Probleme jedoch behoben werden. Ziel dieses Projektes war es daher, ein Protokoll zur Expression von Rhodesain in *E. coli* zu etablieren und somit Mutationsstudien zu ermöglichen. Das Konstrukt bestand aus einer Pro-Rhodesain-Sequenz gefolgt von einer C-terminalen *tabacco etch virus protease* (TEV)-Hydrolysesequenz und einem 6xHis-tag (siehe Abbildung 24). Außerdem wurde, wie in dem Konstrukt aus *P. pastoris*, die bereits beschriebene S277A-Mutation zur Eliminierung der Glykosylierungsstelle eingeführt und die trypanosomentypische C-terminale Domäne des Rhodesains entfernt.

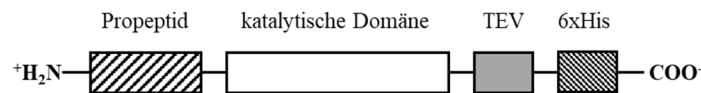


Abbildung 24: Aufbau des Rhodesain-Konstrukts zur heterologen Expression von Rhodesain in *E. coli*.

Nach Transformation in *E. coli* wurde die Transkription des Rhodesain-Gens, welches unter der Kontrolle des *Lac*-Repressors stand bei unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen induziert. Dabei wurden vor und nach der Induktion Zellen entnommen und mittels *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) auf die gewünschte Expression von (Pro-)Rhodesain untersucht. Wie in Abbildung 25 A dargestellt, erschienen bei der SDS-PAGE-Analyse nach der Induktion zwei zusätzliche Banden auf der Höhe von ~35 und ~25 kDa, welche der Größe von Pro-Rhodesain (35.9 kDa) und *mature* Rhodesain (2.3.8 kDa) entsprechen. Daher wurde angenommen, dass die Expression von Rhodesain durch IPTG erfolgreich induziert wurde und es wurden erste Versuche unternommen das exprimierte Protein aus *E. coli* zu isolieren.

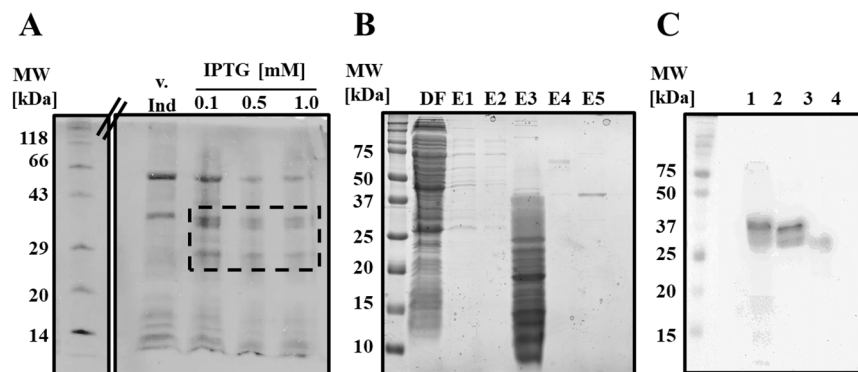


Abbildung 25: Analyse der Expressions- und Aufreinigungsversuche von Rhodesain aus *E. coli* mittels SDS-PAGE und Western-Blot. (A) 14%iges SDS-PAGE-Gel von ArcticExpress Zellen vor und nach der Induktion durch unterschiedliche IPTG-Konzentrationen. Die zusätzlichen Banden nach der Induktion mit IPTG sind hervorgehoben. (B) 15%iges SDS-PAGE-Gel der Ni-NTA-Chromatographie nach Aufschluss der ArcticExpress Zellen. Aufgetragen wurden die Durchfluss- (DF) und Elutionsfraktionen (E1 – E5). (C) Western-Blot mit anti-6xHis-tag-Antikörpern von unterschiedlichen ArcticExpress-Aufschlüssen. Aufschluss in (1) Lysispuffer, (2) Lysispuffer + 0.5% (v/v) TritonX, (3) Lysispuffer + 1 M Urea, (4) Ausschluss von ArcticExpresszellen vor Induktion in Lysispuffer.

Um Rhodesain aus *E. coli* zu isolieren, wurden induzierte Zellen durch Sonifizierung aufgeschlossen und die löslichen Fraktionen über eine Ni-NTA-Säule (oder *ion mediated affinity chromatography*, **IMAC**) aufgereinigt, wobei eine Adhäsion des Rhodesain-Konstrukts an die Säulenmatrix durch dessen 6xHis-tag erwartet wurde. Wie in Abbildung 25 B gezeigt, konnten die beiden Banden von ~35 und ~25 kDa jedoch ausschließlich im **Durchfluss (DF)** gefunden werden. Daher wurde vermutet, dass der für die Bindung an die Ni-NTA-Matrix nötige 6xHis-tag während der Expression oder der Aufreinigung durch Proteasen abgebaut wurde.

Um dies zu überprüfen, wurde ein Western-Blot der löslichen Fraktionen unterschiedlicher Aufschlüsse von *E. coli*-Zellen vor und nach Induktion der Rhodesain-Expression mit 6xHis-tag-Antikörpern durchgeführt. In Abbildung 25 C ist zu erkennen, dass in allen Aufschlüssen (außer der nicht induzierten Zellen, Spur 4) ein 6xHis-getaggtetes Protein auf der Höhe von ~37 kDa detektiert wurde. Da die Banden die erwartete Größe von Pro-Rhodesain aufweisen, wurde geschlussfolgert, dass es sich bei den Signalen um Rhodesain handelte, welches über einen intakten 6xHis-tag verfügte. Das Ergebnis, dass Rhodesain dennoch nicht an Ni-NTA bindet, deckte sich mit den Ergebnissen aus der Dissertation von [REDACTED], welcher ebenfalls vergeblich versuchte, 6xHis-getaggtetes Rhodesain aus *P. pastoris* über eine Ni-NTA-Säule aufzureinigen.^[146] Da die Interaktion des Proteins mit der Säulenmatrix durch mangelnde Zugänglichkeit des 6xHis-tags behindert sein könnte, wurde ein GFP-Fusionsprotein zwischen die TEV-Hydrolysessequenz und den 6xHis-tag kloniert (siehe Abbildung 26), welches den Abstand von Rhodesain zum tag vergrößern sollte. Als weiterer Vorteil ergab sich, dass GFP durch seine charakteristische grüne Farbe leicht zu erkennen und damit der Verbleib und das Verhalten des Konstrukts während der Proteinpräparation leichter nachzuverfolgen war. Das GFP-Gen beinhaltet neun CCC-Codons, für deren Translation tRNAs mit einem GGG-Anticodon benötigt werden. Die Konzentration dieser tRNAs ist in den meisten *E. coli*-Stämmen allerdings sehr niedrig, was zu geringen Proteinausbeuten führen kann. Für die Expression des Rhodesain-GFP-Konstrukts wurden daher Rosetta-Zelllinien verwendet, welche ein deutlich höheres Level an GGG-tRNA aufweisen.

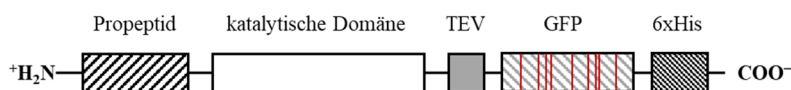


Abbildung 26: Aufbau des Rhodesain-GFP-Konstrukts. Die un favorisierten CCC-Codons innerhalb des GFP-Gens sind in Rot eingezeichnet.

Während der anschließenden Proteinpräparation konnte eine Bindung von grünem Protein an die Ni-NTA-Matrix beobachtet werden. In Abbildung 27 ist beispielhaft ein SDS-PAGE-Gel der verschiedenen Elutionsfraktionen des über eine Ni-NTA-Säule gereinigten Rhodesain-GFP-Konstruktes gezeigt. In allen Elutionsfraktionen ist deutlich eine Bande auf der erwarteten Höhe des Rhodesain-GFP-Konstrukts (~68 kDa) zu erkennen. Neben dieser Bande ist noch eine weitere zu erkennen, welche eine Größe von

~27 kDa aufweist. Da dieses Protein, wie das Gesamtkonstrukt, erst bei höheren Imidazolkonzentrationen eluierte, wurde vermutet, dass es sich dabei um proteolytisch abgespaltenes GFP handelt.

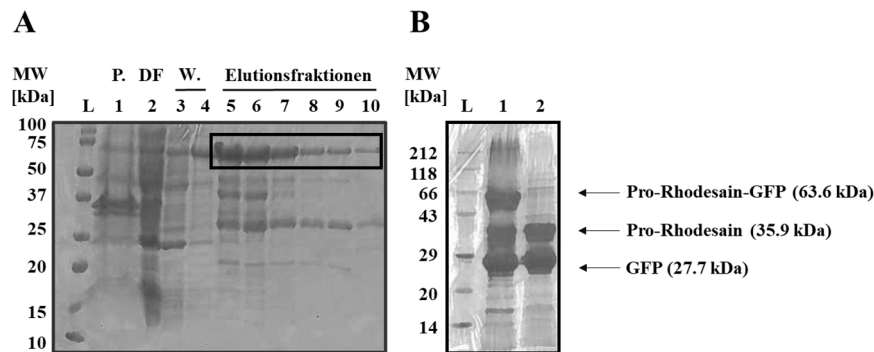


Abbildung 27: SDS-PAGE-Gele der IMAC- und TEV-Hydrolyse-Schritte während der Rhodesain-Aufreinigung. (A) 15%iges SDS-PAGE-Gel der verschiedenen Fraktionen der Proteinpräparation des Rhodesain-GFP-Konstruktes mittels IMAC. Aufgetragen wurde die unlösliche Fraktion des Zellaufschlusses (P., Spur 1), der Durchfluss (DF, Spur 2), die Waschfraktionen mit 20 mM Imidazol (W., Spur 3 – 4) und die Elutionsfraktionen bei 50 mM (Spur 5 – 7) und 100 mM Imidazol (Spur 8 – 10). Die Proteinbande des Pro-Rhodesain-GFP-Gesamtkonstrukts ist hervorgehoben. (B) 14%iges SDS-PAGE-Gel der vereinigten Pro-Rhodesain-GFP-Fraktionen vor (1) und nach (2) der Hydrolyse durch TEV-Protease.

Nach erfolgreicher Abspaltung des GFPs durch die TEV-Protease lag Pro-Rhodesain als inaktives Zymogen mit seiner inhibierenden Pro-Domäne vor (siehe Abbildung 27 B). Diese Pro-Domäne sollte in einen Reifungsprozess autokatalytisch von Rhodesain abgetrennt und das Enzym somit aktiviert werden. Die Autoaktivierung von Pro-Rhodesain wurde in Anwesenheit des Reduktionsmittels **Dithiothreitol (DTT)** und durch Einstellen eines sauren pH-Werts induziert. Dies führte zur Denaturierung des GFPs und dem damit verbundenen Verlust der grünen Färbung. Präzipitiertes Protein wurde durch Zentrifugation entfernt und die katalytische Aktivität der Rhodesain-Lösung während der Aktivierung mit Hilfe des fluoreszenzbasierten Enzymassays (**FBE**) überwacht.

Wie in Abbildung 28 A gezeigt, wurde während der Aktivierung von Rhodesain eine starke Zunahme der katalytischen Aktivität im FBE beobachtet, welche bei längerer Inkubation jedoch wieder abfiel. Dieser Aktivitätsverlust wurde auf unspezifische Autoproteolyse zurückgeführt. Um diese zu verhindern, wurde die Protease beim Erreichen des Aktivitätsplateaus inhibiert. Dazu wurde überschüssiges DTT durch Zugabe von **Kaliumtetrathionat (KTT)** oxidiert und das Enzym mit **Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)** reversibel inhibiert. Diese Inhibition konnte durch erneute Zugabe von DTT aufgehoben werden.

Die Charakterisierung des Pro-Rhodesains und des *mature* Rhodesains mittels *circular dichroism (CD)*-Spektroskopie ergab, dass die Abspaltung der Pro-Domäne zu einer Verringerung des α -helikalen Sekundärstrukturanteils und zu einer Erhöhung β -sheet-Anteils führt.

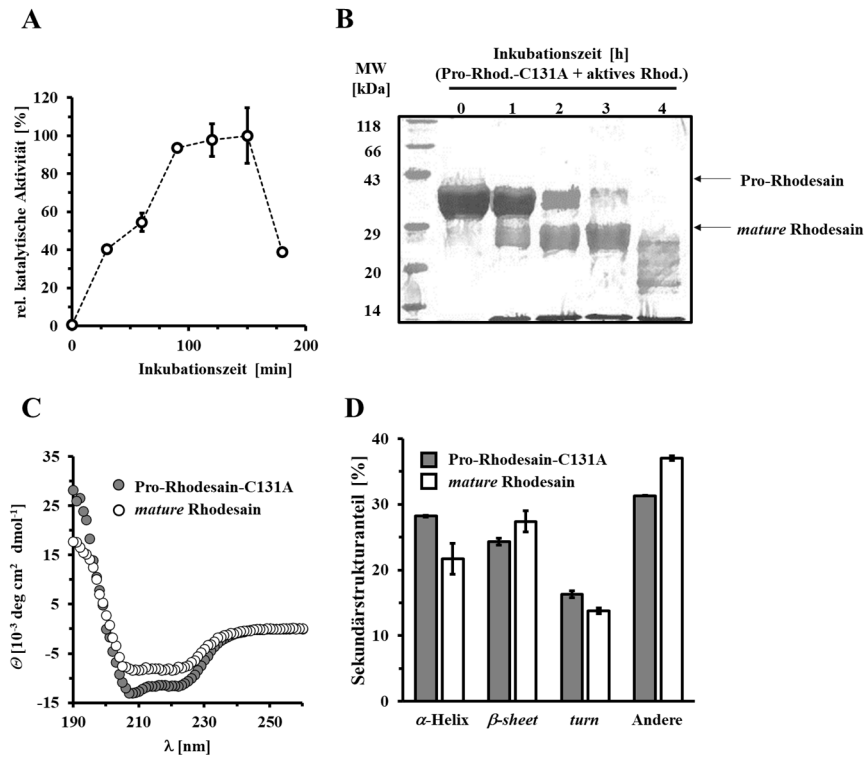


Abbildung 28: Autoaktivierung von Pro-Rhodesain. (A) Die Autoaktivierung von Pro-Rhodesain wurde durch Einstellen eines sauren pH-Werts induziert. Der Enzymlösung wurde zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen und die katalytische Aktivität mittels fluoreszenzbasierter Enzymassays bestimmt. Die katalytischen Aktivitäten der einzelnen Messpunkte sind relativ zur maximal gemessenen Aktivität während der Aktivierung angegeben. Die Inkubationszeit entspricht der Zeit vor der Aktivitätsbestimmung, in der sich Pro-Rhodesain im sauren Milieu befand. (B) 14%iges SDS-PAGE-Gel der Inkubation von inaktivem Pro-Rhodesain-C131A mit aktivem Rhodesain. Die Bande des Pro-Rhodesains nimmt stetig ab, während die Bande des mature Rhodesains zunimmt. Nach 4 h ist eine Abnahme der mature Rhodesain-Bande durch Autoproteolyse zu beobachten. (C) CD-Spektren von inaktivem Pro-Rhodesain-C131A und isoliertem mature Rhodesain. (D) Sekundärstrukturanteile der beiden Proteine basierend auf Berechnungen des Online-tools BeStSel (<http://bestsel.elte.hu/index.php>).

Nach der Aktivierung wurde Rhodesain über eine SEC aufgereinigt und gelagert (siehe Abbildung 29). Diese Methode wurde analog für alle aktiven Mutanten des Rhodesains durchgeführt.

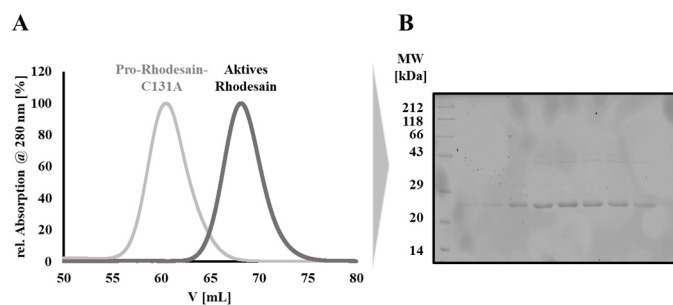


Abbildung 29: SEC-Lauf und das zugehörige SDS-PAGE-Gel von aktiviertem Rhodesain. (A) Dargestellt sind die überlagerten Chromatogramme des SEC-Laufs von mature Rhodesain (Dunkelgrau) und der inaktiven Pro-Rhodesain-C131A-Mutante (Hellgrau). Die Absorptionen bei einer Wellenlänge von 280 nm sind relativ zur maximalen Absorption des jeweiligen Laufs angegeben. Die Abspaltung des Propeptids führt zu einem verringerten hydrodynamischen Radius und damit zu einem vergrößerten Elutionsvolumen von mature Rhodesain im Vergleich zu Pro-Rhodesain. (B) 15%iges SDS-PAGE-Gel des mature Rhodesain-SEC-Laufs. Die Laufhöhe der Banden entsprechen dem Molekulargewicht von mature Rhodesain (23.8 kDa).

Für inaktive C131A-Mutanten entfiel der Aktivierungsschritt. Stattdessen wurde nach der TEV-Hydrolyse eine zweite Ni-NTA-Aufreinigung durchgeführt, bei der sich das inaktive Pro-Rhodesain im Durchfluss befand, während die TEV-Protease und das GFP auf der Ni-NTA-Matrix verblieben (siehe Abbildung 30 A).

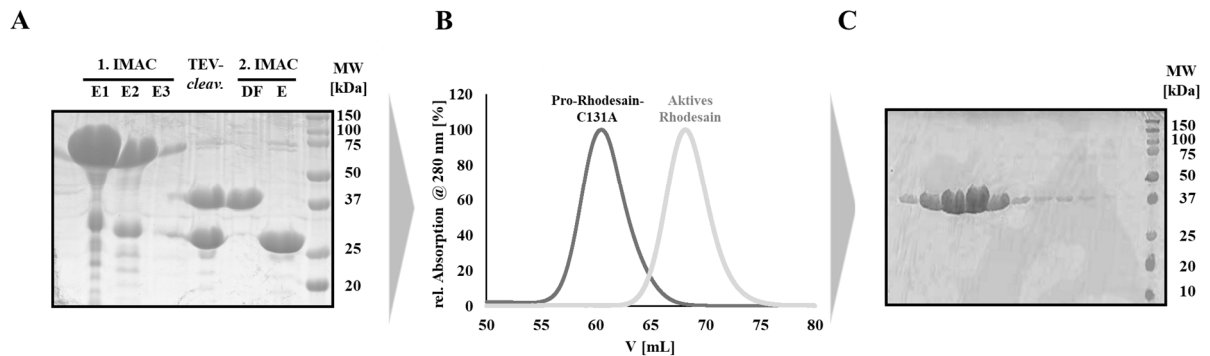


Abbildung 30: Aufreinigung von inaktivem Pro-Rhodesain-C131A-Mutanten. (A) 15%iges SDS-PAGE-Gel der einzelnen Aufreinigungsschritte. Während der ersten IMAC (1. IMAC) wird das Pro-Rhodesain-C131A-GFP (~65 kDa) als Hauptfraktion eluiert. Dieses wird durch die TEV-Protease (TEV-cleav.) in Pro-Rhodesain-C131A (~37 kDa) und GFP (~26 kDa) gespalten. In der anschließenden zweiten IMAC befindet sich Pro-Rhodesain-C131A im Durchfluss (DF), das 6xHis-getagte GFP bindet an Ni-NTA und kann anschließend eluiert werden (E). (B) Überlagerte Chromatogramme von Pro-Rhodesain-C131A (Dunkelgrau) und mature Rhodesain (Hellgrau). (C) 15%iges SDS-PAGE-Gel des SEC-Laufs von Pro-Rhodesain-C131A. Die Banden bei ~37 kDa entsprechen dem erwarteten Molekulargewicht von Pro-Rhodesain.

Das aus *E. coli* gewonnene Rhodesain wurde durch *circular dichroism* (CD)-Spektroskopie, SEC und FBE charakterisiert und mit Rhodesain aus *P. pastoris* verglichen (siehe Abbildung 31 und Tabelle 7).

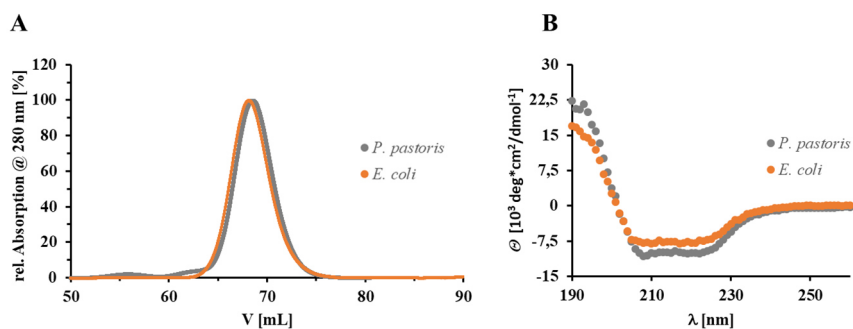


Abbildung 31: Vergleich der heterolog exprimierten mature Rhodesain-Konstrukte aus *E. coli* und *P. pastoris*. (A) Überlagerung zweier SEC-Läufe von Rhodesain aus *E. coli* (Orange) und *P. pastoris* (Grau). (B) Überlagerung der CD-Spektren von Rhodesain aus *E. coli* (Orange) und *P. pastoris* (Grau).

Dabei zeigten die Enzyme beider Expressionssysteme, nahezu identische CD-Spektren und Elutionsvolumina in der SEC, woraus geschlossen wurde, dass beide Proteasen die gleiche Struktur aufweisen. Die geringfügigen Unterschiede in den CD-Spektren wurden auf Konzentrationsunterschiede der jeweils gemessenen Proben zurückgeführt.

Tabelle 7: Enzymkinetische Parameter von mature Rhodesain aus *P. pastoris* und *E. coli*.

Expressionssystem	K_M [μM]	v_{max} [$\Delta\text{FU/s}$]
<i>P. pastoris</i>	5.78 ± 0.5	4.04 ± 0.12
<i>E. coli</i>	4.62 ± 0.42	3.21 ± 0.01

Zudem wiesen die Enzyme beider Systeme bei der Umsetzung des Substrats Z-Phe-Arg-AMC im fluoreszenzbasierten Enzymassay sehr ähnliche enzymkinetische Parameter auf (siehe Tabelle 7), wodurch sie eine vergleichbare katalytische Aktivität und Affinität gegenüber dem Substrat besitzen. Somit wurde davon ausgegangen, dass die Expression von Rhodesain in *E. coli* erfolgreich etabliert wurde.

3.2 Erstmalige Lösung der Kristallstruktur von Pro-Rhodesain

Obwohl Rhodesain schon seit Längerem als vielversprechendes *target* zur Behandlung der Schlafkrankheit angesehen wird und das Enzym eine enorme biologische Relevanz für den Parasiten besitzt, sind viele Eigenschaften bislang nicht vollständig aufgeklärt.

Zu diesen Charakteristika zählt eine fehlende Struktur des Rhodesain-Zymogens, welches einen entscheidenden Schritt im Reifungsprozess der aktiven Protease darstellt.

Daher wurde eine aus *E. coli* (siehe 3.1) gewonnene, inaktive Pro-Rhodesain-Mutante (Pro-Rhodesain-C131A) kristallisiert und die Struktur des Zymogens mittels Röntgenstrukturanalyse gelöst.

3.2.1 Kristallisation von Pro-Rhodesain

Für die Kristallisation wurde das sich schnell prozessierende Pro-Rhodesain stabilisiert, indem statt des Wildtyps die inaktive Mutante-C131A verwendet wurde, in welcher das katalytische Cystein zu Alanin mutiert wurde.^[148] Nach einem *screening* mit Hilfe der Hampton-Research- und SaltRx-Kits wurden die vielversprechendsten Bedingungen optimiert, wobei sich eine 1:1-Mischung aus Protein- und Reservoir-Lösung (Protein-Lsg.: 7 mg/mL Pro-Rhodesain-C131A in 10 mM Natriumcitrat pH 5.0; Reservoir-Lsg.: 40 mM Citrat pH 3.5, 30% PEG-6000, gesättigt $\text{Pb}(\text{OAc})_2$) als optimal erwiesen. Unter diesen Bedingungen kristallisierte Pro-Rhodesain-C131A bei Raumtemperatur innerhalb von 3 – 6 Tagen zu kubischen Kristallen (siehe Abbildung 32), welche für die Röntgenstrukturanalyse verwendet wurden.

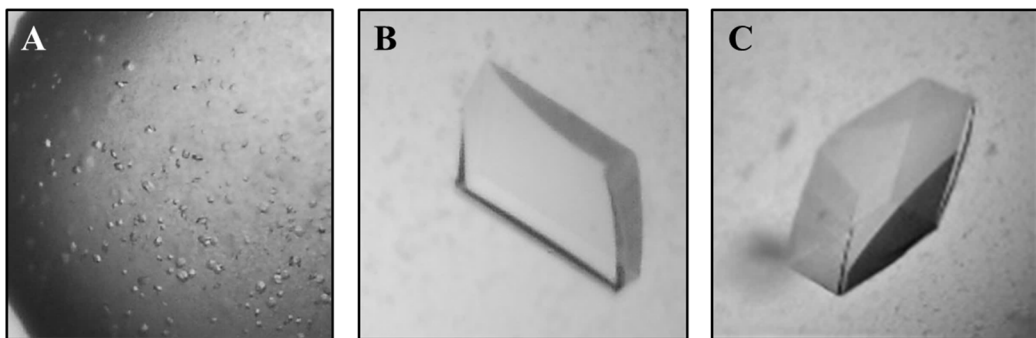


Abbildung 32: Auswirkung der Proteinkonzentration auf die Kristallisation von Pro-Rhodesain-C131A. Die dargestellten Proteinkristalle wurden nach 7 Tagen bei Raumtemperatur aus unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Protein- (7 mg/mL in 10 mM Natriumcitrat pH 5.0) und Reservoirlösung (40 mM Citrat pH 3.5, 30% PEG-6000, gesättigt $\text{Pb}(\text{OAc})_2$) erhalten (Reservoir:Protein = 1:3 (A), 1:2 (B) und 1:1 (C)).

3.2.2 Lösung und Beschreibung der Struktur von Pro-Rhodesain

Das Lösen der Struktur der Pro-Rhodesain-Mutante C131A wurde in Zusammenarbeit mit [REDACTED] durchgeführt. Die Struktur wurde bei einer Auflösung von 2.8 Å in der *space group* H 3 gelöst. Die *unit cell* besitzt die Seitenlängen $a = 123.19 \text{ \AA}$, $b = 123.19 \text{ \AA}$ und $c = 53.9 \text{ \AA}$, sowie die Winkel $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 90.0^\circ$ und $\gamma = 90.0^\circ$. In dieser *unit cell* liegt Pro-Rhodesain als einzige *biological unit*, d.h. als Monomer, vor. Weitere kristallographische Daten der Strukturlösung sind in der nachfolgenden Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Kristallographische Daten und refinement statistics der Pro-Rhodesain-C131A-Kristallstruktur

Eigenschaft	Werte
<i>Space group</i>	H 3
Gitterkonstanten	
a; b; c	123.19 Å; 123.19 Å; 53.9 Å
α ; β ; γ	90.00°; 90.00°; 120°
max. Auflösung [Å]	2.8
Datenvollständigkeit [%]	97
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	3.63 (bei 2.81 Å)
R, R_{free}	0.235, 0.302
Wilson B-Faktor [Å²]	41.2
Total number of atoms	2405
F₀, F_c correlation	0.88
Symmetrie	
<i>favoured</i>	273 \triangleq 91%
<i>allowed</i>	27 \triangleq 9%
<i>outliers</i>	1 \triangleq 0%

Die Struktur lässt sich in das N-terminale Propeptid und die katalytische Domäne aufteilen. Die katalytische Domäne bildet dabei einen globulären Kern, welcher von der Pro-Domäne umspannt wird (siehe Abbildung 33 B). Insgesamt trägt das Propeptid mit ~12 kDa zu ca. 33% des gesamten Molekulargewichts des Proteins von ~35 kDa bei. Die Pro-Domäne von Pro-Rhodesain ähnelt in ihrer Struktur und relativen Orientierung zur katalytischen Domäne den Pro-Domänen anderer CathL-

Proteasen. Dazu gehören die charakteristische Folge aus einer α -Helix (α -Helix 1, H1, $^{\text{Pro}}\text{Leu18} - ^{\text{Pro}}\text{Lys28}$) gefolgt von einem *loop* ($^{\text{Pro}}\text{Tyr29} - ^{\text{Pro}}\text{Lys36}$), einer zweiten α -Helix (α -Helix 2, H2, $^{\text{Pro}}\text{Glu38} - ^{\text{Pro}}\text{Gln56}$), einem weiteren *loop* ($^{\text{Pro}}\text{Ala57} - ^{\text{Pro}}\text{Tyr63}$), einem kurzen β -sheet ($^{\text{Pro}}\text{Tyr63} - ^{\text{Pro}}\text{Phe65}$) und einer dritten α -Helix (α -Helix 3, H3, $^{\text{Pro}}\text{Phe73} - ^{\text{Pro}}\text{Lys94}$).

Da die ersten 17 AS ($^{\text{Pro}}\text{Met1} - ^{\text{Pro}}\text{Ser17}$) des Pro-Rhodesains nicht aufgelöst sind, beginnt die Struktur des Propeptids mit $^{\text{Pro}}\text{Leu18}$ am N-terminalen Ende von Helix 1. Weitere nicht aufgelöste AS sind $^{\text{Pro}}\text{Ala58}$, $^{\text{Pro}}\text{Ala59}$, welche sich am C-terminalen Ende der Helix 2 befinden, und $^{\text{Pro}}\text{Gly105}$ (siehe Abbildung 33 A).

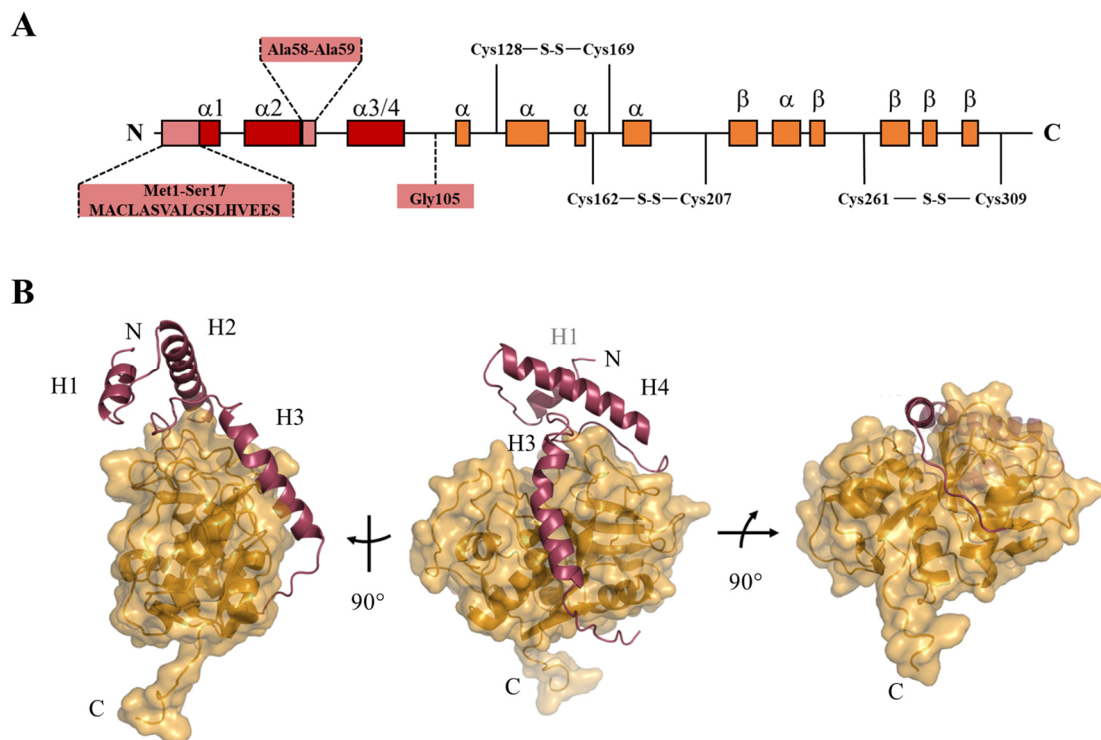


Abbildung 33: Kristallstruktur von Pro-Rhodesain-C131A. (A) Topologiemodell der Struktur von Pro-Rhodesain. Sekundärstrukturen der Pro-Domäne (Rot) und katalytischen Domäne (Orange) sowie Disulfidbrücken sind eingezeichnet. Nicht aufgelöste Sequenzen sind hervorgehoben und in Hellrot unterlegt. (B) Kristallstruktur aus drei unterschiedlichen Perspektiven. Die katalytische Domäne ist in Orange, die Pro-Domäne in Rot dargestellt.

Im Unterschied zur Pro-Domäne sind in der katalytischen Domäne alle AS aufgelöst. Diese umfasst die AS Ala107 – Pro331. Der C-Terminus von Pro-Rhodesain besteht aus den verbliebenen sechs AS (ENLYFQ) der TEV-Protease-Erkennungssequenz.

Im Vergleich mit der Kristallstruktur des *mature* Rhodesain-K11777-Komplexes (PDB-ID.: 2P7U) wird ersichtlich, dass die katalytischen Domänen in beiden Fällen eine nahezu identische Tertiärstruktur aufweisen (siehe Abbildung 14). Diese Ähnlichkeit spiegelt sich zudem in dem niedrigem $C\alpha$ -RMSD-Wert von 0.92 Å wider, welcher sich bei einem Struktur-*alignment* von Pro-Rhodesain mit 2P7U ergibt.

Wie im Rhodesain-K11777-Komplex werden auch im Pro-Rhodesain drei Disulfidbrücken (Cys128-Cys168, Cys162-Cys207 und Cys261-Cys309) ausgebildet. Diese besitzen eine deutliche Elektronendichte und sind daher während der X-ray-Messung intakt geblieben (siehe Abbildung 34). Insgesamt besitzt das Peptidrückgrat der gesamten Struktur (mit Ausnahme der nicht aufgelösten AS) eine deutliche Elektronendichte, weshalb sich Sekundärstrukturen eindeutig erkennen lassen (siehe Abbildung 34).

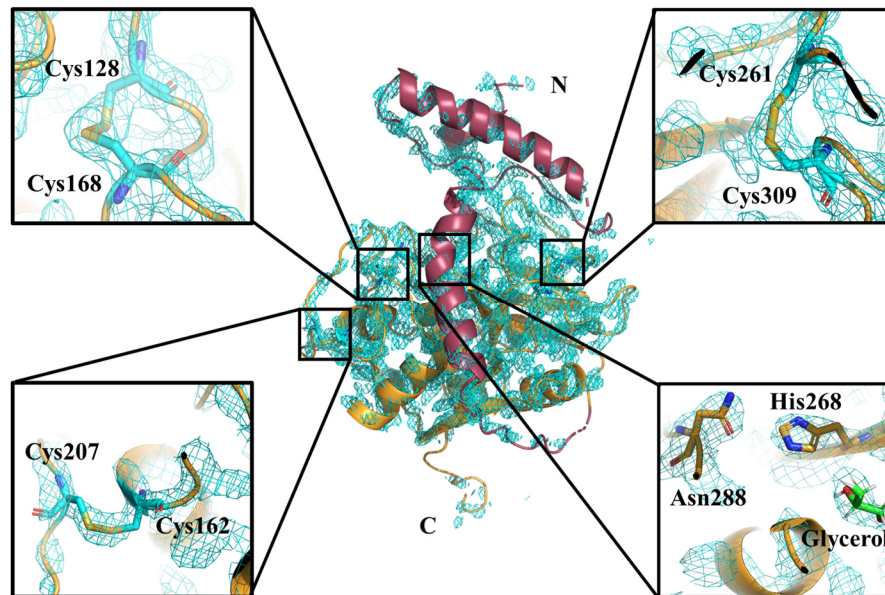


Abbildung 34: Elektronendichtekarte der Kristallstruktur von Pro-Rhodesain-C131A und ausgewählter Elemente innerhalb der katalytischen Domäne. Gezeigt ist die Struktur des Proteins mit der katalytischen Domäne (Orange) und der Pro-Domäne (Rot) sowie die Elektronendichtekarte (Cyan) bei einem Sigma-Level von 2.0. Die drei Disulfidbrücken sowie die active site mit ihren verbleibenden zwei AS der katalytischen Triade, Asn288 und His268, sind vergrößert dargestellt. Zudem ist das eingelagerte Glycerolmolekül (Grün) in der active site dargestellt.

Zudem lässt die Kristallstruktur von Pro-Rhodesain darauf schließen, dass die Pro-Domäne eine höhere Dynamik aufweist als die katalytische Domäne. Dies geht aus den unterschiedlichen B-Faktoren der beiden Bereiche hervor (siehe Abbildung 35). Der B-Faktor kann als Maßstab für die Dynamik angesehen werden, da er angibt wie definiert die Position eines Atoms im Modell bzw. der Struktur ist.^[149]

Wie in Abbildung 35 zu erkennen ist, bildet die katalytische Domäne der Pro-Rhodesain-Struktur einen „Kern“ mit niedrigen B-Faktor-Werten ($\leq 30 \text{ \AA}^2$), während Lösungsmittel-exponierte und flexible *loop*-Regionen deutlich höhere Werte ($50 - 80 \text{ \AA}^2$) und damit eine stärkere Dynamik aufweisen. Insgesamt hat die katalytische Domäne einen durchschnittlichen B-Faktor von 44.2 \AA^2 pro Aminosäure.

Im Vergleich dazu ist der durchschnittliche B-Faktor pro AS des Propeptids mit 55.6 \AA^2 deutlich höher. Besonders rigide Regionen befinden sich innerhalb der Helix 1 sowie in dem Abschnitt zwischen Helix 2 und 3, der ein β -sheet mit dem *propeptide binding loop* (PBL) der katalytischen Domäne

ausbildet. Die höchsten B-Werte besitzen hingegen der C-Terminus der Pro-Domäne und das N-terminale Ende der Helix 3.

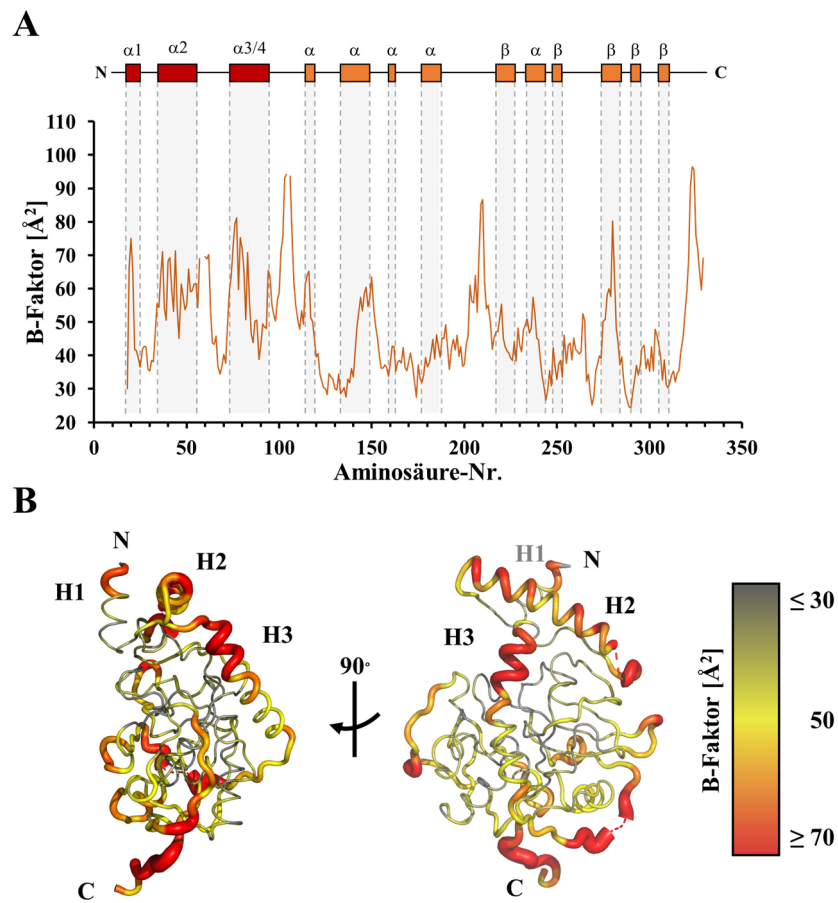


Abbildung 35: B-Faktoren der Pro-Rhodesain-Struktur. (A) Auftragung der durchschnittlichen B-Werte einzelner AS gegen ihre jeweilige Nummerierung im Pro-Rhodesain-Gesamtkonstrukt. (B) Kristallstruktur von Pro-Rhodesain aus zwei verschiedenen Perspektiven. Die einzelnen Bereiche wurden entsprechend ihrer B-Werte angefärbt. Eine Farbskala zu den Werten ist rechts dargestellt.

3.2.3 Wechselwirkung innerhalb der Pro-Domäne

Innerhalb der Pro-Domäne geht der größte Anteil polarer Interaktionen von Helix 2 aus, wobei reine *intra-main-chain*-Wechselwirkungen von dieser Betrachtung ausgeschlossen sind. Dabei sind vor allem die WW von ^{Pro}Glu38 und ^{Pro}Arg42 hervorzuheben, da diese Teil des ER(A/V)FNAA-Motivs sind. ^{Pro}Arg42 wechselwirkt mit der Seitenkette von ^{Pro}Glu77, welche sich am N-terminalen Ende der Helix 3 befindet (siehe Abbildung 36 A). Diese Interaktion konnte bereits in anderen Zymogenen der CathL-Familie, wie z. B. Pro-Papain (siehe Abbildung 9) beobachtet werden. Im Gegensatz zur Pro-Papain-Struktur wird jedoch keine Wechselwirkung zwischen ^{Pro}Glu38 und ^{Pro}Arg42 ausgebildet. Stattdessen interagiert ^{Pro}Glu38 mit dem Peptidrückgrat von ^{Pro}Lys34.

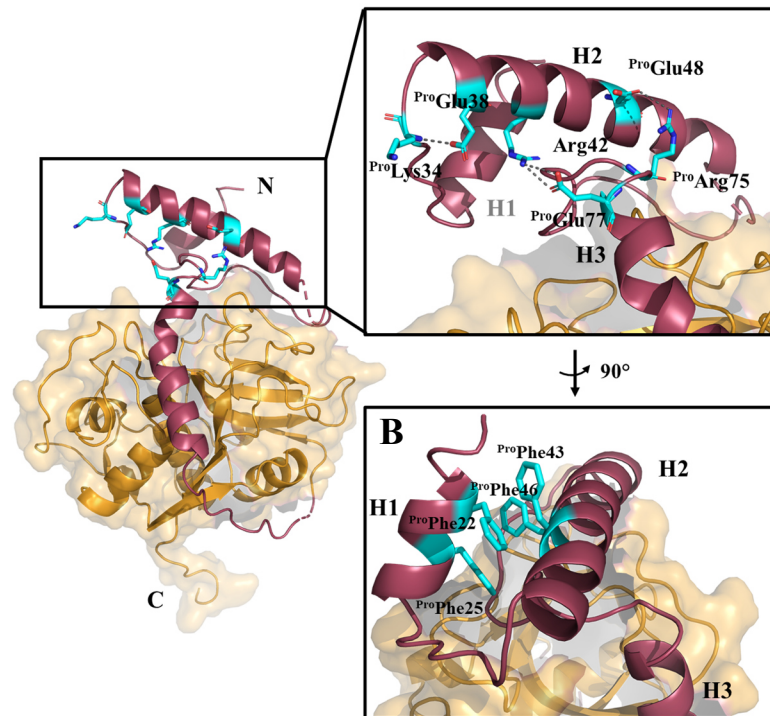


Abbildung 36: Interaktionen der Aminosäureseitenketten innerhalb des Propeptids von Pro-Rhodesain. (A) Polare WW die von Aminosäureseitenketten der Helix 2 ausgebildet werden. (B) Potentielles π -System zwischen den Helices 1 und 2.

Die aromatischen Seitenketten von ^{Pro}Phe22 und ^{Pro}Phe25, welche sich innerhalb der Helix 1 befinden, bilden mit den Seitenketten von ^{Pro}Phe43 und ^{Pro}Phe46 der Helix 2 ein π -stacking System (siehe Abbildung 36 B). Dies ist ein weiteres Motiv innerhalb der Pro-Rhodesain-Struktur, welches auch in anderen CathL-Zymogenen zu finden ist.

Weitere polare WW werden zwischen den Seitenketten von ^{Pro}Glu48 und ^{Pro}Arg75 ausgebildet. Auffallend ist, dass nach den oben genannten Bereichen keine weiteren polaren Seitenketteninteraktionen innerhalb der Pro-Domäne zu erkennen sind.

3.2.4 Wechselwirkung zwischen der katalytischen Domäne und der Pro-Domäne

Der Großteil der Wasserstoffbrücken zwischen der Pro-Domäne und der katalytischen Domäne ist innerhalb des kurzen β -sheets zu finden. Dieses wird zwischen einer Peptidsequenz, die an zweiten loop des Propeptids anschließt, und dem *propeptide binding loop* (PBL) der katalytischen Domäne ausgebildet (siehe Abbildung 37). Abgesehen von diesen *backbone*-Interaktionen besteht die einzige polare Wechselwirkung innerhalb dieser Region aus den Interaktionen der Seitenketten von ^{Pro}Asn49 und Glu252.

Darüber hinaus findet eine weitere polare WW zwischen der Seitenkette von ^{Pro}Arg97 am C-terminalen Ende der H4 mit dem Peptidrückgrat von Leu224 und Val315 der katalytischen Domäne statt. Dabei ist

H4 ein besonderes Strukturmerkmal von Pro-Rhodesain im Vergleich zu anderen CathL-Zymogenen, auf welches im nachfolgenden Kapitel eingegangen wird.

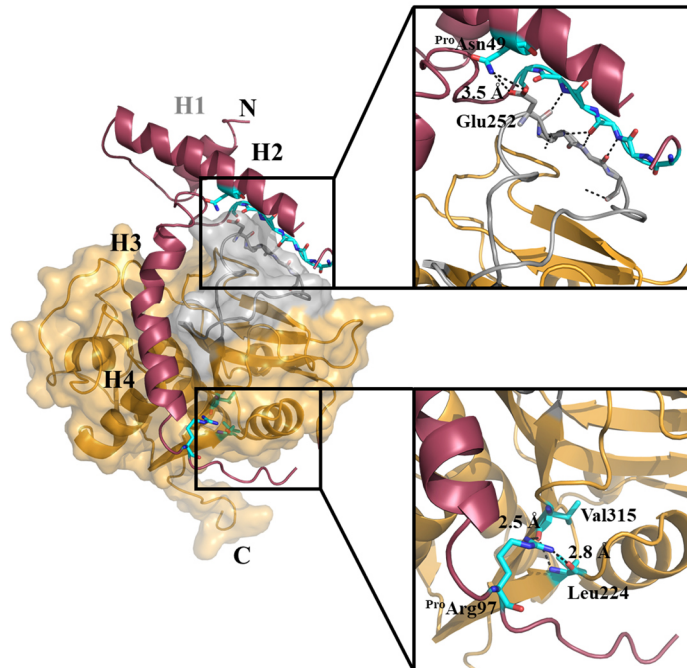


Abbildung 37: Backbone-Interaktionen des β -sheets (Cyan) zwischen der Pro-Domäne und dem propeptide binding loop (PBL, Grau) der katalytischen Domäne, sowie die Wechselwirkung zwischen ^{Pro}Arg97 und Leu224 bzw. Val315.

3.2.5 Helix 4 – Ein besonderes *Feature* im Rhodesain-Propeptid

Im Vergleich mit anderen Kristallstrukturen von Zymogenen der CathL-Familie ist die Helix 3 in der Rhodesain Pro-Domäne deutlich verlängert und erstreckt sich als *blocking peptide* über den gesamten *active site cleft*, weshalb dieser zusätzliche helikale Abschnitt im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Helix 4 oder H4 (^{Pro}Arg83 – ^{Pro}Lys94) bezeichnet wird. Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 38 eine Überlagerung mit anderen Pro-Cathepsin-Kristallstrukturen dargestellt. Dazu wurden sechs PDB-Strukturen ausgewählt, welche im *similarity search* des Programms *molecular operating environment* (*MOE*) die höchste Sequenz-Identität zu Pro-Rhodesain aufwiesen. Hierbei zeigt sich deutlich, dass H4 ausschließlich in Pro-Rhodesain zu finden ist.

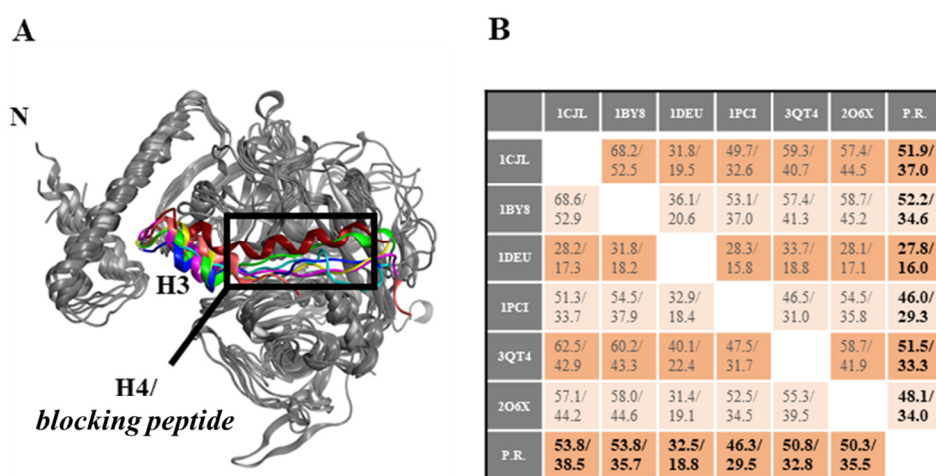


Abbildung 38: Vergleich zwischen Pro-Rhodesain und unterschiedlichen Zymogenen der CathL-Familie im Bereich der blocking peptide. (A) Überlagerung der unterschiedlichen Kristallstrukturen. Ausgewählt wurden PDB-Strukturen, die während eines similarity searches im Programm MOE die höchsten Sequenz-Identitäten zu Pro-Rhodesain aufwiesen. Helix 3 und die blocking peptides sind farblich hervorgehoben: Rot = Pro-Rhodesain, P.R.; Grün = F. hepatica Pro-CathL, 2O6X; Blau = H. sapiens Pro-CathL, 1CJL; Pink = C. papaya Pro-Caricain, 1PCI; Türkis = H. sapiens Pro-CathX, 1DEU, Gelb = H. sapiens Pro-CathK, 1BY8; und Beige = T. molitor CathL, 3QT4. (B) Auflistung der Similaritäten/Identitäten der verschiedenen Strukturen untereinander (Grau) oder in Bezug zu Pro-Rhodesain (Schwarz). Der Wert einer Reihe *i* und einer Spalte *j* berechnet sich durch die Anzahl identischer AS der alignierten Sequenzen der Strukturen von *i* und *j* in Relation zur Anzahl der AS von *j*.

Die Elektronendichtekarte oder *electron density map* (EDM) einer Struktur ist die Zuordnung der Intensität der Elektronendichte für jeden Punkt im *real space*. Da sich für die gesamte Karte eine durchschnittliche Intensität und deren Standardabweichung σ berechnen lässt, kann die Intensität jedes einzelnen Punkts in der EDM auch als das Vielfache von σ beschrieben werden, mit der sie über der durchschnittlichen Intensität liegt. Das Sigma-Level stellt das Mindestmaß dieses Vielfachen dar, das erreicht werden muss, damit in der EDM Elektronendichte an einem bestimmten Punkt angezeigt wird.^[150] Je höher das Sigma-Level einer Elektronendichtekarte ist, desto valider kann sie somit angesehen werden. Da die Elektronendichte entlang der Helix 4 und der aromatischen Seitenketten von ^{Pro}Tyr82, ^{Pro}Tyr88 und ^{Pro}Phe89 bei einem Sigma-Level von 2 noch deutlich zu erkennen ist, kann die Ausrichtung von Helix 4 als glaubwürdig angesehen werden (siehe Abbildung 39).

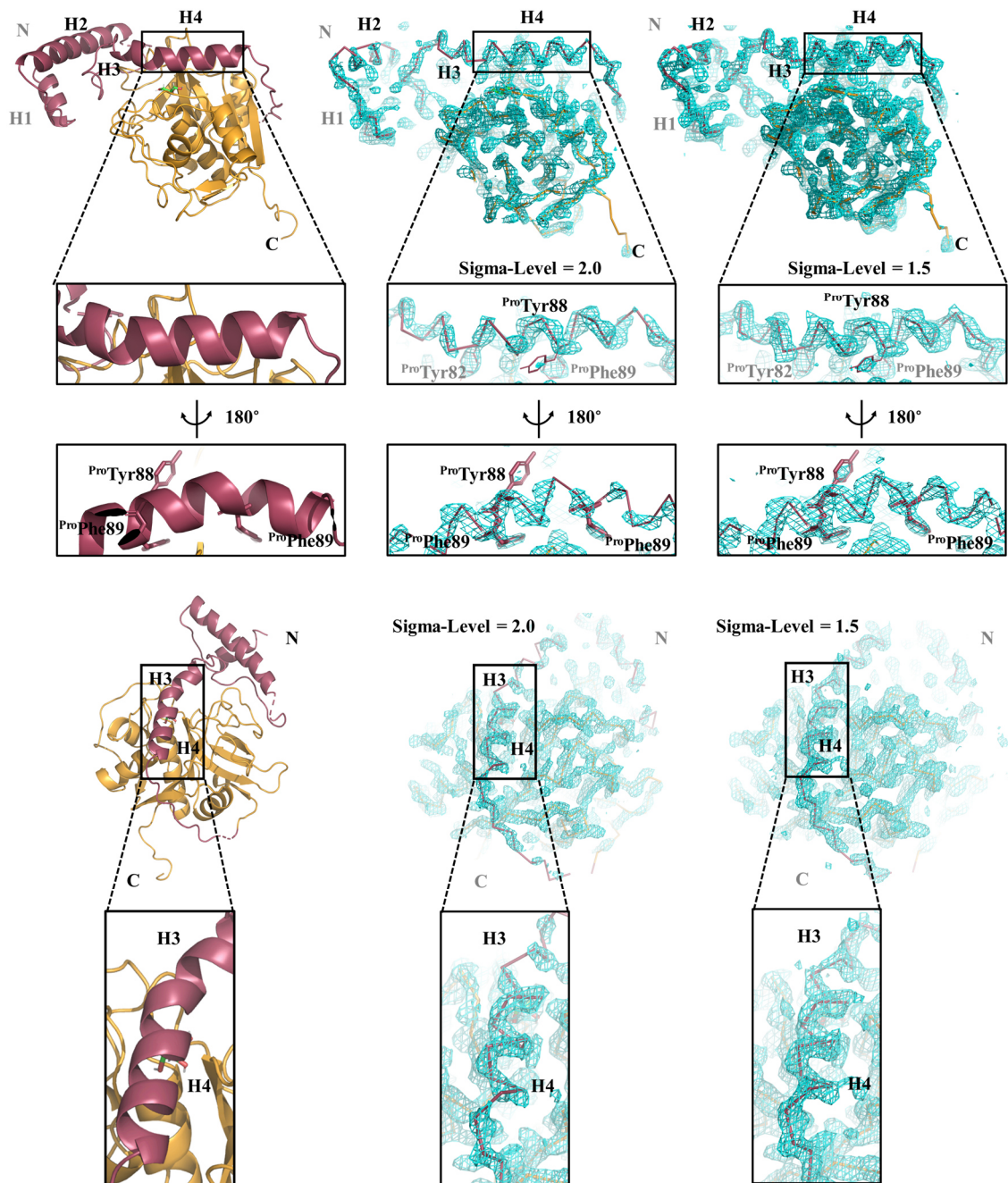


Abbildung 39: Elektronendichtekarten entlang der Helix 4 (H4) von Pro-Rhodesain bei unterschiedlichen Sigma-Leveln aus verschiedenen Perspektiven. Die Elektronendichtekarten sind bei den Sigma-Leveln von 2 und 1.5 dargestellt. Zudem ist der Bereich der Helix 4 hervorgehoben, in welchen die aromatischen Seitenketten von *ProTyr82*, *ProTyr88* und *ProPhe89* eine deutliche Elektronendichte besitzen.

Des Weiteren bildet Helix 4 im Kristall nur wenige Kontakte zu anderen Proteinmonomeren aus, weshalb es unwahrscheinlich ist, dass die Ausbildung von H4 durch die Kristallisation induziert wurde und somit auch im gelösten Protein existieren müsste (siehe Abbildung 40).

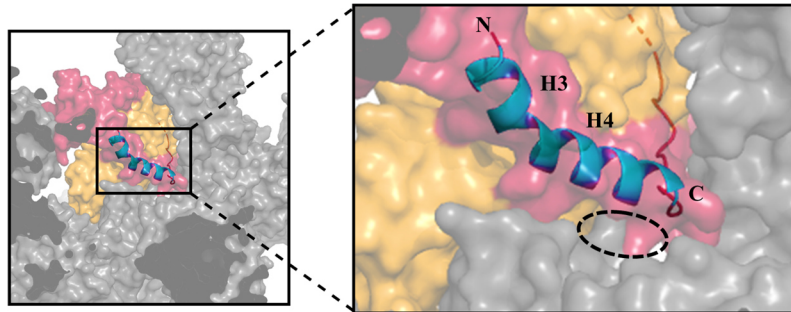


Abbildung 40: Kristallkontakte zwischen Helix 4 und anderen Protein-Monomeren. Gezeigt ist ein zentrales Pro-Rhodesain-Monomer, das farbig hervorgehoben ist (katalytische Domäne Orange; Pro-Domäne Rot) und symmetry mates im Abstand von 8 Å (Grau). Der Bereich der H4 ist vergrößert dargestellt und die Kontaktfläche zwischen H4 und einem anderen Pro-Rhodesain-Monomer eingezeichnet.

Um zu überprüfen, ob das trypanosomale *blocking peptide* auch in Lösung bzw. in Abwesenheit der katalytischen Domäne die Fähigkeit besitzt eine α -Helix auszubilden, wurden CD-Spektren vom isolierten Peptid (Seq._(tryp.) = ^+H_3N -RNGAS-YFAAAQK-CONH₂) aufgenommen. Als Vergleich wurde das *blocking peptide* (Seq._(human) = ^+H_3N -NGLQNRKPR-CONH₂) des humanen Pro-Cathepsin L untersucht, da in dessen Kristallstruktur (PDB-ID: 1CJL) keine α -Helix zu erkennen ist.

Die CD-Spektren dieser Peptide wurden bei pH 4.0 und 8.0 mit steigenden 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE)-Konzentrationen aufgenommen (siehe Abbildung 41). Dabei induziert TFE die Ausbildung von Sekundärstrukturen in Peptiden indem es Wassermoleküle von deren Oberfläche verdrängt. Da TFE selbst keine Wasserstoffbrücken (H-Brücken) mit dem Peptidrückgrat eingeht, werden stattdessen H-Brücken innerhalb des Peptid-Rückgrats durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen gebildet.^[151]

Eine alternative Erklärung für die Sekundärstruktur-induzierende Wirkung von TFE ist, dass es den ungefalteten Zustand der Peptide destabilisiert, indem es strukturierend auf Lösungsmittelmoleküle wirkt.^[152] Die erhaltenen Spektren sowie die durch *BeStSel* berechneten Sekundärstrukturanteile der einzelnen Messungen sind in Abbildung 41 dargestellt.

Wie zu erkennen ist, wurde für beide Peptide eine strukturelle Änderung mit steigenden TFE-Konzentrationen beobachtet. Dabei ist auffällig, dass nur das trypanosomale *blocking peptide* eine α -helikale Struktur ausbildet. Dies geht sowohl aus den Berechnungen des *BeStSel*-Programms als auch aus der Elliptizität bei einer Wellenlänge von 222 nm hervor, welche in CD-Spektren ein charakteristisches Minimum von α -Helices darstellt.^[153] Dies wurde im Falle des humanen *blocking peptide* nicht beobachtet.

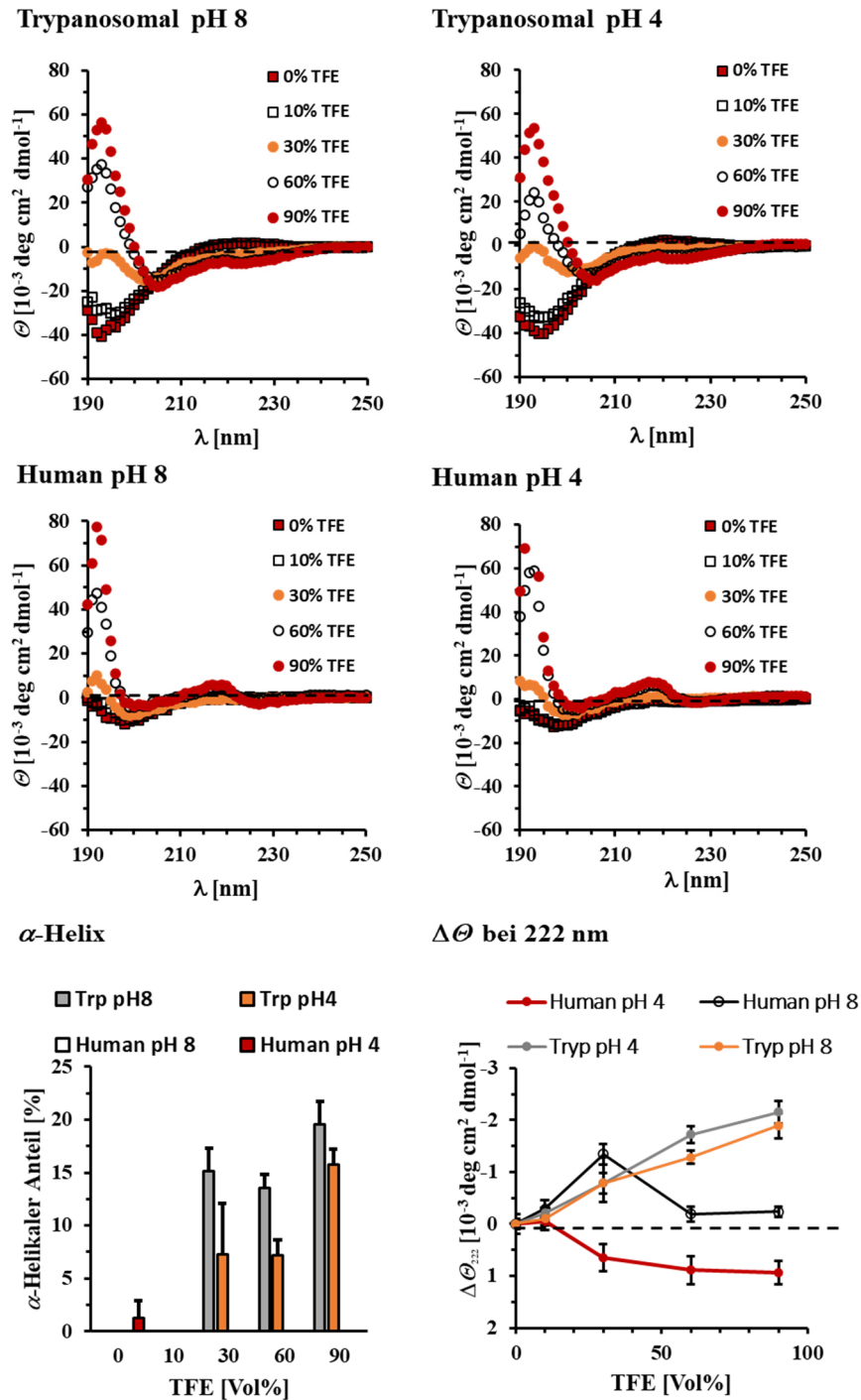


Abbildung 41: CD-Spektroskopie der TFE-Titrations von humanen und trypanosomal blocking peptide. Dargestellt sind die CD-Spektren des trypanosomal und humanen blocking peptide bei pH 4.0 und 8.0 sowie unterschiedlichen 2,2,2-Trifluorethanol-Konzentrationen. Die α -helikalen Sekundärstrukturanteile der beiden Peptide wurden aus den CD-Spektren durch das Online-Tool BeStSel berechnet. Zudem sind die Änderungen der Elliptizitäten bei einer Wellenlänge von 222 nm mit steigender TFE-Konzentration aufgetragen.

Ein Peptid-BLAST (*basic local alignment search tool*, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) dieser trypanosomalen Helix-Sequenz zeigte weiterhin, dass die Sequenz innerhalb der trypanosomalen Pro-Cathepsine hochkonserviert ist und es sich dabei um ein charakteristisches Motiv dieser Gattung handelt. Übereinstimmungen mit Cathepsinen aus anderen Organismen ergaben sich nicht. Eine Auflistung der Top-Hits des Peptid-Blasts der Rhodesain-*blocking-peptide*-Sequenz im Vergleich, sowie deren Unterschiede und biologischer Ursprung ist in der nachfolgenden Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Top-Hits nach Identität des Peptid-BLASTs des Rhodesain-blocking peptide. Aufgelistet sind ausschließlich Peptidsequenzen von Proteasen. Abweichungen in der Sequenzidentität sind in Rot dargestellt. Das Fehlen einer AS wurde durch „X“ gekennzeichnet.

Cysteinprotease-Vorläufer	Spezies	Sequenz	Identität [%]
Pro-Rhodesain	<i>T. b. rhodesiense</i>	+H ₃ N-RNGASYFAAAQKR-CO ₂ ⁻	100
Pro-Cathepsin L	<i>T. b. equiperdum</i>	+H ₃ N-RNGASYFAAAQKR-CO ₂ ⁻	100
Pro-Cruzipain	<i>T. cruzi</i>	+H ₃ N-RNGASYFAAAQKR-CO ₂ ⁻	100
Pro-Cathepsin L	<i>T. evansi</i>	+H ₃ N-RNGASYFAAAQKR-CO ₂ ⁻	100
Pro-Cathepsin L	<i>T. b. gambiense</i>	+H ₃ N-RNGASYFAAAQKR-CO ₂ ⁻	100
LmCPB2.8	<i>L. mexicana</i>	+H ₃ N-XNGAAYFAAAQKR-CO ₂ ⁻	83
Pro-Cathepsin L	<i>T. rangeli</i>	+H ₃ N-XNAAAHFAAAQKR-CO ₂ ⁻	75

Zusätzlich wurde die gesamte Rhodesain-Propeptidsequenz mit den Aminosäuresequenzen von diversen Pro-Cathepsinen *alignt*. Dazu wurden AS-Sequenzen von Cathepsinen ausgewählt, für welche eine Zymogen-Kristallstruktur existiert oder welche in verwandten Trypanosomenspezies exprimiert werden. Dabei ergaben sich hohe Similaritäten und Identitäten im Bereich der Helix 3 (siehe Abbildung 42). Im Unterschied dazu, war die Sequenz der Helix 4 nur in trypanosomalen Gattungen konserviert. In allen übrigen Spezies zeigte dieser Bereich eine hohe Varianz sowohl in Bezug zu Rhodesain als auch untereinander.

Organismus	PDB-ID	H 3	H 4
1 <i>T. b. rhodesiense</i>	----	AN----PYATFGVTPFSDMTREEFRARYRNGASYFAAAQKRL--RKTVNVTGR	125 (106)
2 <i>T. cruzi</i>	----	AN----PHATFGVTPFSDLTREEFRSRYHNGAAHFAAAQERA--RVPVKVEVVG	122
3 <i>T. b. equiperdum</i>	----	AN----PYATFGVTPFSDMTREEFRARYRNGASYFAAAQKRL--RKTVNVTGR	125
4 <i>T. b. gambiense</i>	----	an----pyatfgvtpfsdmtREEFRARYRNGASYFAAAQKRL--RKTVNVTGR	79
5 <i>T. congolense</i>	----	an----pyatfgvtrfSDMSPEEFRATYHNGAEYAAALKRP--RKVVNVSTGK	125
6 <i>T. vivax</i>	----	an----phatfgvtpfsdltPEEFRTRYHNGERHFEEAARGRV--RTLQVPPGK	118
7 <i>T. dionisii</i>	----	an----phatfgvtpfsdltREEFRSRHSGAAHFAAGRKRA--RVPVDVGVGD	113
8 <i>T. theileri</i>	----	an----phamfgvtrfSDLTREEFRQRYINGEAYFKMAERRL--RRPVEVPAGN	121
9 <i>H. sapiens</i>	1CJL	EYREGKHSFTMAMNAFGDMTSEEFRQVMNGFQNRKPRKGKVFQEPL-----FYE	113 (113)
10 <i>C. papaya</i> (Caricain)	1PCI	KN----NSYWLGLNEFADLSNDEFNEKYVGS LIDATIE-QS-YDEEFINEDTVN	133 (133)
11 <i>C. papaya</i> (Papain)	4QRX	KN----NSYWLGLNVFADMSNDEFKKEYTGS IAGNYTTTEL-SYEEVLNDGDVN	134
12 <i>F. hepatica</i>	2O6X	RHDLGLVYTYTLGLNQFTDMTFEEFKAKYLT---EMSRASDILSHGVPYEAANRA	115 (107)
13 <i>T. molitor</i>	3QT4	KFEKGEVITYSKAMNQFGDMSKEEFLLAVYVNRGKAQKPKHPENL--RMPYVSSKKP	107

Abbildung 42: Ausschnitt des Alignments der Rhodesain-Pro-Domäne mit den AS-Sequenzen von Pro-Cathepsinen. Align wurden die Peptidsequenzen der Rhodesain-Pro-Domäne mit den Sequenzen von CathL-Proteasen aus anderen Trypanosomen oder Cathepsinen mit gelöster Zymogen-Kristallstruktur durch das Online-Tool Clustal Omega. Gezeigt ist der Bereich in der Nähe der Helices 3 und 4 von Pro-Rhodesain. Bereiche hoher Similarität/Identität wurden innerhalb der Helix 3 (bezogen auf die Pro-Rhodesain-Kristallstruktur) grau und innerhalb von Helix 4 rot unterlegt.

Obwohl Unterschiede in der Struktur und der Sequenz von Helix 4 zu *blocking peptides* anderer CathL-Zymogenen bestehen, nimmt sie dennoch eine ähnliche Orientierung entlang des *active site clefts* ein. Das bedeutet, dass die Ausrichtung der C- und N-Termini im Vergleich zu peptidischen Substraten invertiert ist (siehe Abbildung 43).

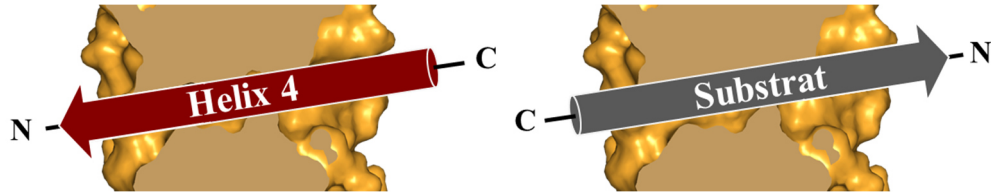


Abbildung 43: Orientierung der Helix 4 und Peptidsubstraten hinsichtlich der N- und C-Termini innerhalb des active site clefts der Cathepsin L-Proteasen.

Dabei besetzen die Seitenketten der AS $^{\text{Pro}}\text{Phe89}$ und $^{\text{Pro}}\text{Tyr88}$ der H4 die Substratbindestellen der S2- und der S3-Tasche, während die Seitenketten von $^{\text{Pro}}\text{Arg81}$ und $^{\text{Pro}}\text{Tyr82}$ die S' bzw. die S1'-Tasche besetzen (siehe Abbildung 44 A). Somit nehmen die Seitenketten des $^{\text{Pro}}\text{Phe89}$ und $^{\text{Pro}}\text{Tyr88}$ dieselben Substratbindestellen wie das Phenylalanin und die *N*-Methylpiperazin-Gruppe des bekannten Inhibitors K11777 ein. Dies wird aus einer *alignment* der Struktur von Pro-Rhodesain mit der des Rhodesain-K11777-Komplexes (Abbildung 44 B; PDB-ID.: 2P7U) ersichtlich und ist in Übereinstimmung mit den inhibitorischen Eigenschaften der CathL-Propeptide. Auch erklärt dies rückblickend, weshalb beim *screening*-basierten Design von K11777 letztlich das *N*-Methyl-Phe-hPhe-Rückgrat eingeführt wurde.^[119]

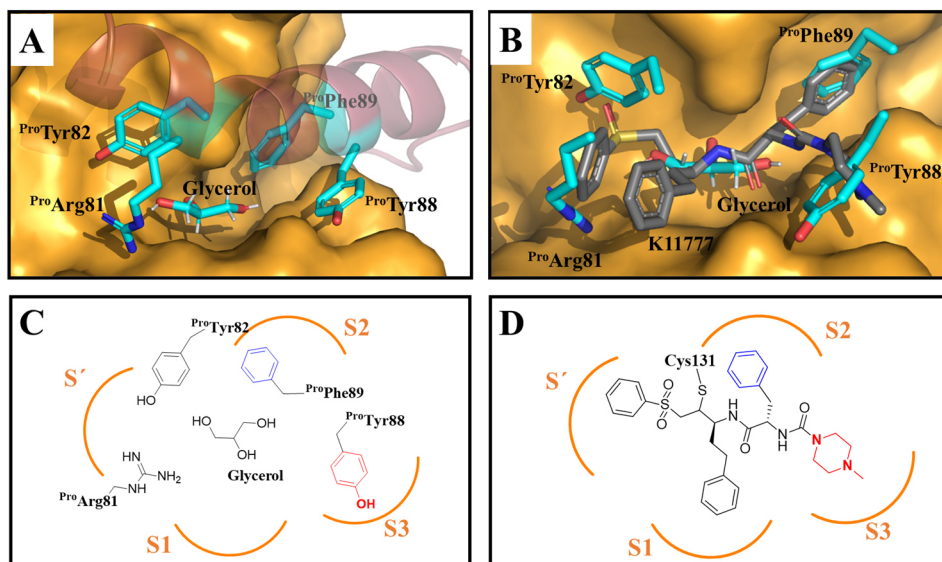


Abbildung 44: Vergleich der Bindung von Helix 4 und dem Inhibitor K11777 an die katalytische Domäne von Rhodesain im Bereich der Substratbindestasche. (A) Orientierung der Seitenketten von $^{\text{Pro}}\text{Arg81}$, $^{\text{Pro}}\text{Tyr82}$, $^{\text{Pro}}\text{Tyr88}$ und $^{\text{Pro}}\text{Phe89}$ der H3/4 innerhalb des active site clefts. (B) Überlagerung der Seitenketten von $^{\text{Pro}}\text{Arg81}$, $^{\text{Pro}}\text{Tyr82}$, $^{\text{Pro}}\text{Tyr88}$ und $^{\text{Pro}}\text{Phe89}$ (Cyan) und dem Cysteinprotease-Inhibitor K11777 (Grau). Die Überlagerung wurde durch alignment der Pro-Rhodesain-Struktur und der Kristallstruktur 2P7U generiert. (C) 2D-Darstellung der $^{\text{Pro}}\text{Arg81}$ -, $^{\text{Pro}}\text{Tyr82}$ -, $^{\text{Pro}}\text{Tyr88}$ - und $^{\text{Pro}}\text{Phe89}$ -Seitenkettenorientierungen in den Substratbindestaschen der katalytischen Domäne. (D) 2D-Darstellung des Bindemodus von K11777 an Rhodesain.

3.3 Untersuchung der Autoaktivierung von Pro-Rhodesain

Die Aktivierung von Rhodesain durch das Abspalten der Pro-Domäne ist ein entscheidender Schritt in der Biosynthese der aktiven Protease. Dieser Reifungs- oder *maturing*-Prozess wird bei anderen CathL-Proteasen durch ein Senken des pH-Werts induziert (siehe Abschnitt 1.4) und wurde auch während der heterologen Expression von Rhodesain aus *E. coli* zur gezielten Aktivierung der Protease genutzt (siehe Abschnitt 3.1.3).

Um pH-sensitive Gruppen bzw. WW zu identifizieren, die den *maturing*-Prozess kontrollieren, wurden *molecular dynamic* (MD)-Simulationen bei den pH-Werten 4 und 8 durchgeführt. Basierend auf diesen Simulationen wurden WW identifiziert, welche als pH-sensitive Trigger dienen könnten. Der Einfluss dieser WW wurde anschließend durch Mutagenesestudien verifiziert.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Abspaltung der Pro-Domäne als eine intramolekulare Reaktion, bei der ein Rhodesain-Molekül sich selbst schneidet (*cis-cleavage*), oder als eine intermolekulare Reaktion, in welcher ein aktives Rhodesain ein anderes prozessiert (*trans-cleavage*), verläuft. Dazu wurden unterschiedliche Mutanten generiert und deren Verhalten in Gel-*shift*-Assays, CD-Spektroskopie und PET-FCS-Experimenten untersucht.

3.3.1 Die Autoaktivierung von Pro-Rhodesain beinhaltet einem pH-abhängigen *trans-cleavage*-Prozess

Die Prozessierung von Pro-Rhodesain zu aktivem *mature* Rhodesain geschieht durch die Abspaltung der Pro-Domäne. Ein solcher Prozess kann entweder durch andere Proteasen katalysiert werden, oder durch eine Autoaktivierung geschehen, in welcher Rhodesain sich selbst aktiviert. Bei einer Autoaktivierung kann zudem zwischen *cis*- und *trans-cleavage* unterschieden werden.

Während der heterologen Expression und Reinigung von Rhodesain aus *E. coli* wurde beobachtet, dass sich isoliertes Pro-Rhodesain durch das Einstellen eines sauren pH-Werts autoaktiviert.

Zur Untersuchung eines möglichen *trans-cleavage*-Prozesses, wurde die inaktive Pro-Rhodesain-C131A-Mutante mit geringen Mengen an reifem WT-Rhodesain versetzt. Durch die C131A-Mutation wurde das katalytische Cystein des Pro-Rhodesains entfernt, wodurch ein *cis-cleavage* ausgeschlossen wurde. Nach Zugabe von aktivem *mature* Rhodesain wurden dem Gemisch zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen, welche umgehend denaturiert und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert wurden. Dabei sollte das Abspalten der Pro-Domäne durch aktives Rhodesain in einem *trans-cleavage*-Prozess zu einer Verringerung des Molekulargewichts um ~12 kDa und somit zu einem veränderten Laufverhalten in der SDS-PAGE führen. Dieser Gel-*shift*-Assay wurde bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. In Abbildung 45 A sind die Coomassie-Brillantblau angefärbten SDS-PAGE-Gele abgebildet, die den Verlauf der Reaktion bei pH 4.0, 5.5, 6.5 und 8.0 zeigen.

In diesen ist zu erkennen, dass die Intensität der Pro-Rhodesain-Bande bei ~37 kDa im Verlauf der Reaktion bei pH 6.5, 5.5 und 4.0 abnimmt und bei pH 8.0 konstant bleibt. Gleichzeitig nimmt die Bandenintensität von *mature* Rhodesain bei ~26 kDa zu (siehe Abbildung 45 A). Somit ist deutlich die pH-Abhängigkeit der Prozessierung zu erkennen, welche mit sinkendem pH-Wert zunehmend schneller verläuft.

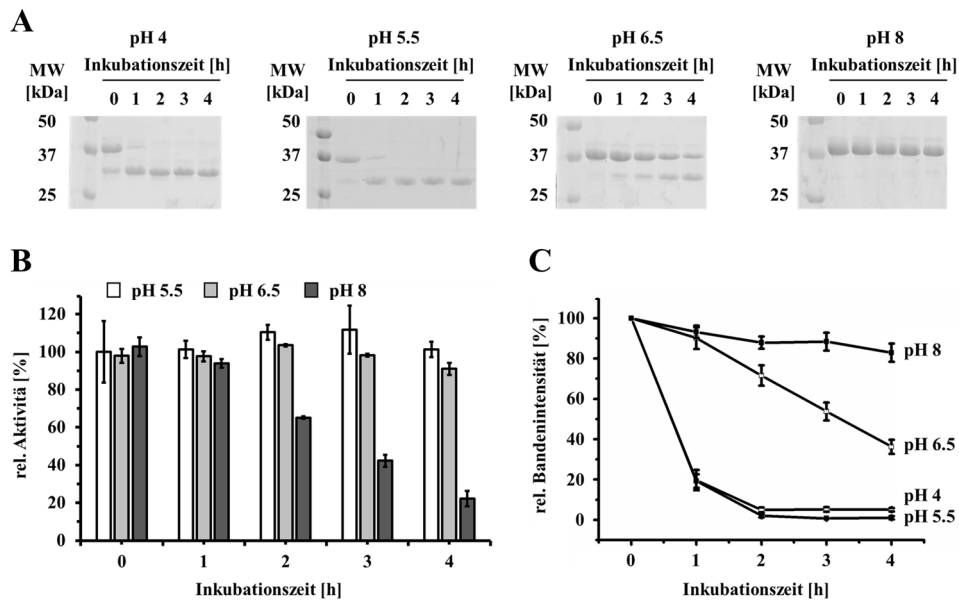


Abbildung 45: Untersuchung eines potenziellen *trans-cleavage*-Prozesses während der Autoaktivierung von Pro-Rhodesain. (A) 15%ige SDS-PAGE-Gele des Verdaus von inaktivem Pro-Rhodesain-C131A durch *mature* Rhodesain bei den pH-Werten 4.0, 5.5, 6.5 und 8.0 nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. (B) Katalytische Aktivitäten von *mature* Rhodesain nach unterschiedlichen Vorinkubationszeiten in Puffern verschiedener pH-Werte. Die katalytischen Aktivitäten wurden relativ zum Zeitpunkt $t = 0$, pH 5.5 gesetzt. (C) Auftragung der relativen Intensitäten der Pro-Rhodesain-Banden gegen die Inkubationszeit.

Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der katalytischen Aktivität des *mature* Rhodesains und der Umsetzung von Pro-Rhodesain besteht, wurde aktives *mature* Rhodesain bei pH 5.5, 6.5 und 8.0 inkubiert und dessen katalytische Aktivität nach unterschiedlichen Inkubationszeiten im fluoreszenzbasierten Enzymassay (FBE) bestimmt (siehe Abbildung 45 B).

Aus den dargestellten Daten lässt sich schließen, dass Rhodesain einen *trans-cleavage*-Prozess durchlaufen kann und dass dieser pH-abhängig ist. Dies geht aus den Gel-*shift*-Assays hervor, in denen ein beschleunigter Umsatz von Pro-Rhodesain durch *mature* Rhodesain mit sinkendem pH-Wert zu erkennen ist. Die pH-Abhängigkeit der Umsetzung resultiert jedoch nicht aus einer geänderten katalytischen Aktivität des *mature* Rhodesains, da trotz gleicher, robuster Aktivitäten bei pH 6.5 und 5.5 im FBE eine unterschiedlich schnelle Umsetzung von Pro-Rhodesain im Gel-*shift*-Assay beobachtet wurde. Auch behält das *mature* Rhodesain selbst nach 2 h Inkubation bei pH 8.0 über 50% seiner katalytischen Aktivität. Dennoch ist auf dem SDS-PAGE-Gel nur ein geringer Umsatz des Pro-Rhodesains bei diesem pH-Wert zu erkennen.

3.3.2 Struktur von Pro-Rhodesain bleibt unter sauren Bedingungen erhalten

Aus den Gel-*shift*-Assays (siehe Abschnitt 3.3.1) ging hervor, dass die Autoaktivierung von Pro-Rhodesain als ein rein pH-abhängiger *trans-cleavage* Prozess ablaufen könnte. In diesem katalysiert ein aktives Rhodesain-Molekül die Aktivierung weiterer Proteasen durch Abspaltung der Pro-Domänen. Ein solcher Prozess setzt jedoch eine initiale Population an aktivem Rhodesain voraus.

Während der Synthese von Rhodesain aus *E. coli* (siehe Kapitel 3.1) konnte jedoch bereits ohne Zugabe von aktivem Rhodesain eine Autoaktivierung beobachtet werden. Da aus der Kristallstruktur von Pro-Rhodesain (3.2) hervorging, dass Helix 4 des Zymogens vor der Aktivierung inhibierend über der aktiven Tasche des Enzyms liegt, müsste es daher im Falle eines reinen *trans-cleavage*-Prozesses zunächst zu einer Freisetzung der *active site* unter aziden Bedingungen kommen. Ein solcher hypothetischer Mechanismus, in dem die Pro-Domäne die katalytische Domäne verlässt, ist in der nachfolgenden Abbildung 46 schematisch dargestellt.

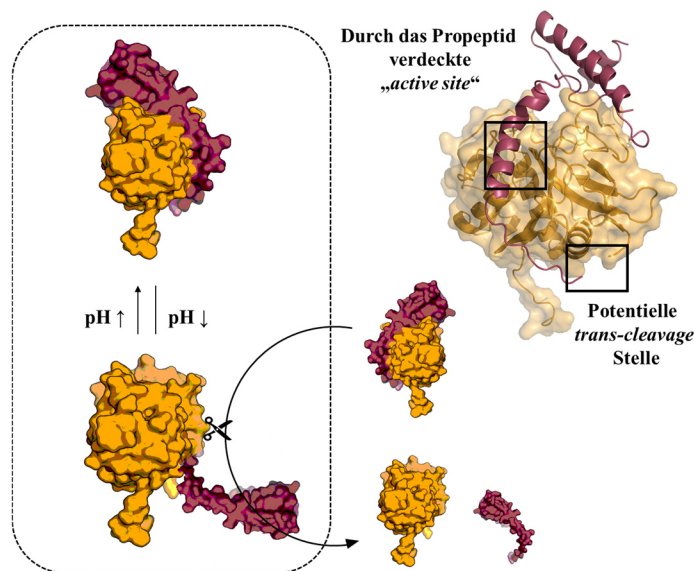


Abbildung 46: Hypothetischer Mechanismus der Aktivierung von Pro-Rhodesain. Durch ein Sinken des pH-Wertes kommt es zu einer Konformationsänderung, in welcher das Propeptid (Rot) die active site der katalytischen Domäne (Orange) freigibt. Durch die Freisetzung der active site ist es dem Enzym möglich, andere Pro-Rhodesain-Moleküle zu prozessieren.

Um die Hypothese einer aufklappenden Pro-Domäne zu überprüfen, wurden in Kooperation mit [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] *photoinduced electron transfer-fluorescence correlation spectroscopy* (PET-FCS)-Studien durchgeführt.

Für diese Experimente wurden Pro-Rhodesain-C131A-Mutanten verwendet, welche an definierten Stellen der Pro-Domäne mit einem Oxal11-Farbstoff markiert wurden. Durch Einführen eines zusätzlichen Tryptophans innerhalb der katalytischen Domäne, welches in Kontakt mit dem Farbstoff kommen kann, wurde somit ein *Dye-Quencher*-Paar erzeugt. In diesen Konstrukten sollte das

Aufklappen der Pro-Domäne zu einer Distanzvergrößerung zwischen dem Oxal11-Farbstoff und Tryptophan führen, wodurch eine Fluoreszenzsteigerung durch Ausbleiben des PET-Effekts zu erwarten wäre (siehe Abbildung 47).

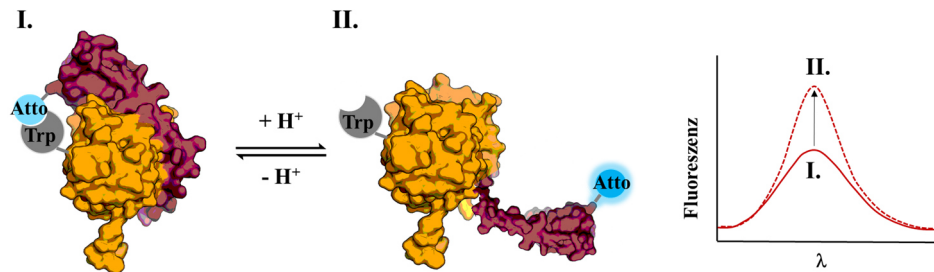


Abbildung 47: Darstellung des PET-Systems zur Untersuchung eines pH-abhängigen binären Gleichgewichts zweier Pro-Rhodesain-Konformationen. Die Farbstoff-markierte Pro-Domäne gibt möglicherweise unter aziden Bedingungen die katalytische Domäne frei (I. → II.), was zu einer Distanzvergrößerung zwischen dem Farbstoff und dem Tryptophan und damit zu einem Anstieg der Fluoreszenz in den Fluoreszenzspektren führt.

Die Markierung des Pro-Rhodesains geschah durch die Reaktion einer Maleimid-Gruppe des Farbstoffs mit der Seitenkette eines artifiziellen Cysteins innerhalb der Pro-Domäne. Um eine selektive Markierung zu ermöglichen wurde zudem ^{Pro}Cys3 der Pro-Domäne zu Serin mutiert. Eine Reaktion mit den verbliebenen sechs nativen Cystein-Seitenketten wurde als unwahrscheinlich erachtet, da diese Disulfidbrücken ausbilden. Die C3S-Mutante, welche kein zusätzliches, artifizielles Cystein beinhaltet, diente als Kontrolle der Markierungsreaktion. Anhand dieser konnte gezeigt werden, dass es während der Markierung zu ~10% unspezifischer Bindung des Farbstoffs an das Protein kommt, was für die anschließenden Messungen als tolerierbar angenommen wurde. Anschließend wurden an unterschiedlichen Stellen des Pro-Rhodesains Cysteine und Tryptophane als *Quencher* inkloniert. Die jeweiligen Cystein-Tryptophan-Paare sind in der nachfolgenden Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: In PET-FCS-Experimenten verwendete Pro-Rhodesain-Mutanten.

PET-FCS-Mutante	Kontrolle
Pro-Rhodesain-C3S-A80C-Q127W-C131A	Pro-Rhodesain-C3S-A80C-C131A
Pro-Rhodesain-C3S-V32C-Q127W-C131A	Pro-Rhodesain-C3S-V32C-C131A

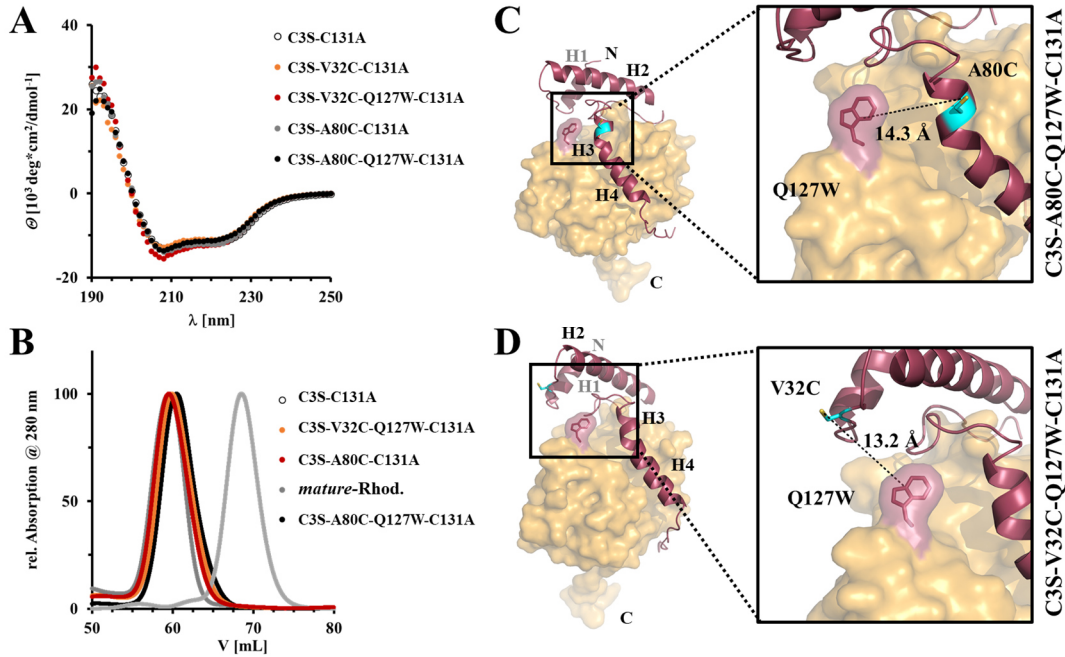


Abbildung 48: Vergleich zwischen unterschiedlichen inaktiven Pro-Rhodesain-C131A-Mutanten, welche für PET-FCS-Experimente genutzt wurden. (A) Überlagerung der CD-Spektren der Pro-Rhodesain-Mutanten. (B) SEC-Läufe verschiedener Pro-Rhodesain-Mutanten im Vergleich zu mature Rhodesain. (C + D) Darstellung der inaktiven Pro-Rhodesain-Mutanten. Die katalytische Domäne ist in Orange und die Pro-Domäne in Rot gezeigt. Die Bereiche, in denen sich die eingeführten Mutationen befinden, sind hervorgehoben. Die Distanzen zwischen dem künstlichen Tryptophanen (Hellrot) und den künstlichen Cysteinen (Cyan), über welche die Proteine Fluoreszenz-markiert wurden, sind eingezeichnet.

Zudem wurde mittels *size exclusion chromatography* (SEC) und *circular dichroism* (CD)-Spektroskopie überprüft, ob die Mutationen zu einer strukturellen Änderung des Pro-Rhodesains führten (siehe Abbildung 48). Da alle Mutanten nahezu identische CD-Spektren und Elutionsvolumina in der SEC besaßen, wurde dies ausgeschlossen.

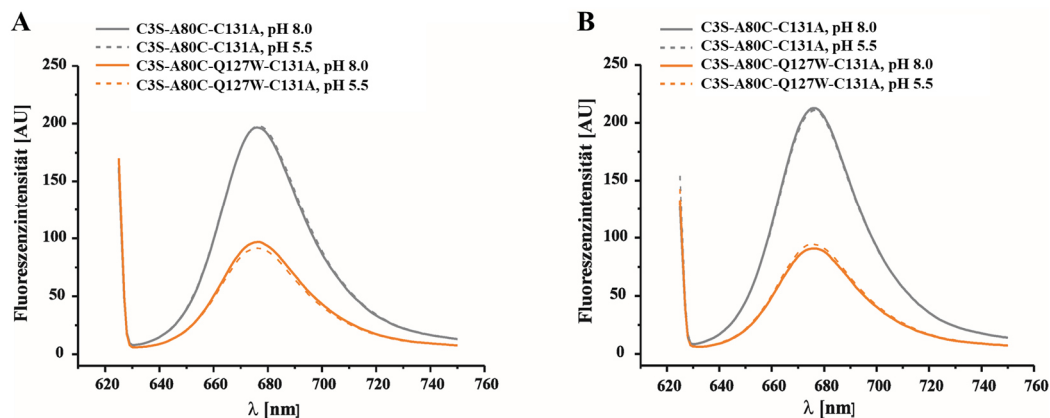


Abbildung 49: Fluoreszenzspektren der Farbstoff-markierten Pro-Rhodesain-Mutanten bei verschiedenen pH-Werten. (A) Oxa11-markierte C3S-A80C-Q127W-C131A-Mutante (Orange) und deren Kontrolle (Oxa11-Pro-Rhodesain-C3S-A80C-C131A, Grau) bei pH 5.5 und 8.0. (B) Oxa11-markierte C3S-V32C-Q127W-C131A-Mutante (Orange) und deren Kontrolle (Oxa11-Pro-Rhodesain-C3S-V32C-C131A, Grau) bei pH 5.5 und 8.0.

In Abbildung 49 sind die Fluoreszenzspektren der Oxa11-markierten Pro-Rhodesain-Mutanten C3S-A80C-Q127W-C131A und C3S-V32C-Q127W-C131A sowie ihrer Fluoreszenz-markierten Kontrollen (Oxa11-Pro-Rhodesain-C3S-A80C-C131A, Oxa11-Pro-Rhodesain-C3S-V32C-C131A) dargestellt. Wie zu erkennen ist, führte das Einführen eines zusätzlichen Tryptophans im Vergleich zur Kontrolle zu einem starken Fluoreszenzverlust, woraus sich schließen lässt, dass ein *Dye-Quencher*-Paar erfolgreich gebildet wurde (siehe Abbildung 49). Allerdings konnte keine Rückgewinnung der Fluoreszenz durch das Einstellen eines sauren pH-Wertes beobachtet werden. Die Ergebnisse dieser Versuche widersprechen somit der Hypothese einer aufklappenden Pro-Domäne im Säuren im Sinne eines binären Systems aus zwei Konformationen (siehe Abbildung 47).

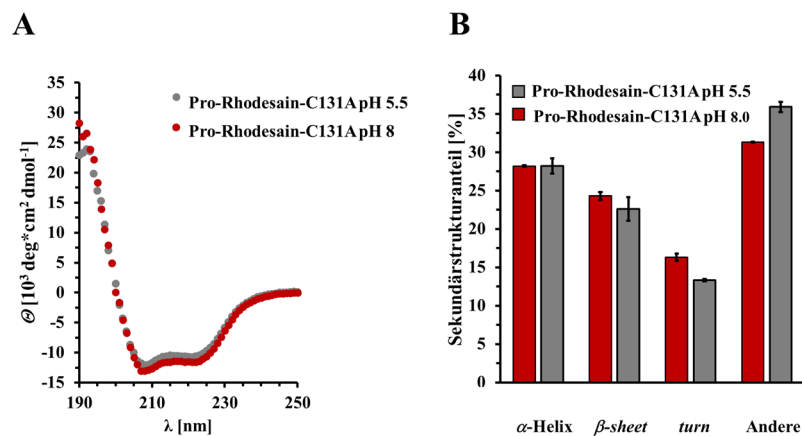


Abbildung 50: CD-Spektroskopie von Pro-Rhodesain-C131A zur Untersuchung einer möglichen pH-induzierten Strukturänderung. (A) CD-Spektren von Pro-Rhodesain-C131A bei pH 5.5 und 8.0. (B) Berechnete Sekundärstrukturanteile basierend auf den CD-Spektren der Pro-Rhodesain-C131A-Mutante durch das Online-Tool BeStSel.

Ergänzend zu den PET-Messungen wurden CD-Spektren von Pro-Rhodesain-C131A bei pH 5.5 und 8.0 aufgenommen, um mögliche Konformationsänderungen zu detektieren. Bei einer Entfaltung der Pro-Domäne wäre eine starke Änderung des α -helikalen Sekundärstrukturanteils zu erwarten. Wie in Abbildung 50 A und B zu erkennen ist, ließen sich jedoch keine gravierenden Unterschiede in den CD-Spektren bei pH 5.5 und 8.0 beobachten, weshalb ein pH-abhängiger Sekundärstrukturverlust ausgeschlossen wurde. Diese Resultate decken sich somit mit den Ergebnissen der PET-Messungen.

Im Unterschied zu den bereits gezeigten „statischen“ Messungen (siehe Abbildung 49) konnte durch die Kombination aus PET- und FCS-Messungen ein pH-abhängiges Verhalten von Pro-Rhodesain beobachtet werden. So deutet die Zunahme der Diffusionszeitkonstanten τ_D beim Sinken des pH-Werts von 8.0 auf 5.5 auf eine Vergrößerung des hydrodynamischen Radius von Pro-Rhodesain im aziden Milieu hin (siehe Abbildung 51). Dieses Verhalten wurde für alle Mutanten beobachtet und kann als eine Lockerung der Struktur oder eine schwache Formveränderung interpretiert werden.

Darüber hinaus ist eine pH-abhängige Änderung der PET-Kinetik der Pro-Rhodesain-C3S-A80C-Q127W-C131A-Mutante zu erkennen (siehe Abbildung 51, C + D). Diese verläuft unter pH 8.0

monoexponentiell mit einer Zeitkonstante von $\sim 1 \mu\text{s}$ und spaltet sich bei pH 5.5 in einen bi-exponentiellen Verlauf mit zwei Zeitkonstanten von $0.19 \mu\text{s}$ und $2.1 \mu\text{s}$ auf. Die Summe der Amplituden bei pH 5.5 (A_1 und A_2) entsprach dabei der Amplitude A_1 bei pH 8.0. Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Gesamtfluoreszenzlöschung bei beiden pH-Werten gleich blieb, die Dynamik des Systems unter aziden Bedingungen jedoch heterogener wurde. Dieses Ergebnis könnte somit als eine Lockerung des Pro-Peptids interpretiert werden.

Während eine Zunahme der Diffusionszeitkonstanten τ_D unter aziden Bedingungen für beide *Dye-Quencher*-Paare (V32C-Q127W, A80C-Q127W) beobachtet wurde, trat der Wechsel von einer mono- zu einer bi-exponentiellen PET-Kinetik nur bei der A80C-Q127W-Mutante auf. Obwohl die Zeitkonstante τ_1 der V32C-Q127W-Mutante ebenfalls eine leichte pH-Sensitivität besitzt ($0.16 \mu\text{s}$ bei pH 8.0 auf $0.19 \mu\text{s}$ bei pH 5.5), wurde bei keinem pH-Wert eine bi-exponentielle PET-Kinetik detektiert (siehe Abbildung 51, A + B). Da sich die artifiziellen Cysteine, über deren Seitenketten das Protein mit dem Farbstoff markiert wurde, in unterschiedlichen Bereichen des Propeptids befanden, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass bestimmte Bereiche der Pro-Domäne stärker gelockert werden als andere. Während sich die A80C-Mutation innerhalb der Helix 3 befand, wurde die V32C-Mutation in den *loop* zwischen Helix 1 und Helix 2 eingeführt. Eine mögliche Interpretation wäre somit, dass ein azides Milieu die Dynamik der Helix 3 erhöht, sie jedoch einen geringeren Einfluss auf die Dynamik des Bereichs zwischen Helix 1 und 2 hat.

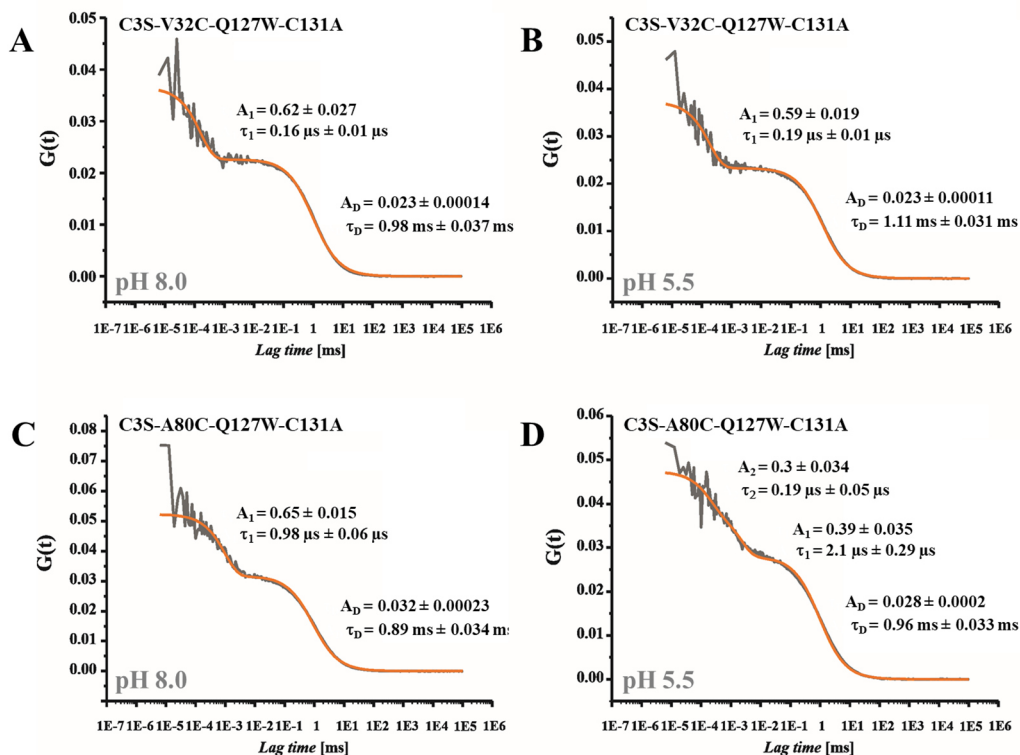


Abbildung 51 PET-FCS-Messungen von Pro-Rhodesain unter aziden und basischen Bedingungen bei 37°C . Dargestellt sind die PET-FCS-Spektren der Fluoreszenz-markierten Pro-Rhodesain-C3S-V32C-Q127W-C131A-Mutante bei pH 8.0 (A) und pH 5.5 (B), sowie die der Fluoreszenz-markierten Pro-Rhodesain-C3S-A80C-Q127W-C131A-Mutante bei pH 8.0 (C) und pH 5.5 (D). Die Autokorrelation ist in Grau, der jeweilige Fit in Orange dargestellt. Die Amplituden A und Zeitkonstanten τ zu den jeweiligen Ereignissen sind eingetragen.

3.3.3 MD-Simulationen geben Hinweis auf Trigger der pH-induzierten Autoaktivierung

Im Weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden basierend auf der gelösten Pro-Rhodesain-Kristallstruktur MD-Simulationen durchgeführt, um Einblick in die Dynamiken und WW zwischen der katalytischen Domäne und der Pro-Domäne zu erhalten. Die Simulationen wurden bei pH 4 und 8 über 20 ns bei 25 °C von [REDACTED] durchgeführt, um mögliche Interaktionen zu identifizieren, welche als Trigger für die pH-induzierte Aktivierung dienen könnten.

Als Grundlage hierfür dienten Ergebnisse aus vorherigen Aktivierungsstudien während der Proteinpräparation und Versuchen zur Autoaktivierung, welche zeigten, dass ein Sinken des pH-Werts entscheidend für die Aktivierung der Protease ist. Daher wurde vermutet, dass eine pH-Änderung von 8 auf 4 zur Protonierung von geladenen AS-Seitenketten und zur Auflösung von ionischen WW führt, welche letztlich entscheidend für die Aktivierung des Pro-Rhodesains sind. Bei einem Zutreffen der Hypothese, müssten die entscheidenden WW in den Berechnungen bei pH 8 deutlich häufiger als bei pH 4 zu beobachten sein.

Als Vorbereitung für die MD-Simulationen wurden zunächst nicht aufgelöste Seitenketten der Struktur mit Ausnahme der ersten 17 Aminosäuren ergänzt.^[155] Anschließend wurden die theoretischen pK_a-Werte der protonierbaren Seitenketten in MOE berechnet und ihr Protonierungszustand anhand dieser Werte festgesetzt. Eine vollständige Liste der AS-Seitenketten mit den berechneten pK_a-Werten ist im Anhang in Tabelle 70 aufgeführt.

Basische Seitenketten lagen dabei in allen Simulationen protoniert vor, wohingegen saure Seitenketten nur in den Simulationen bei pH 4.0 protoniert waren, wenn sie einen theoretischen pK_a-Wert von > 4 aufwiesen. Eine Ausnahme bildeten die Seitenketten von Cys131 und His268 der katalytischen Triade, welche in jeder Simulation ein Thiolat-Histidinium-Ionenpaar bildeten. Gegebenheiten, wie beispielsweise eine 50%ige Protonierung von sauren Seitenketten mit einem pK_a-Wert von 4 bei pH 4, wurden bewusst vernachlässigt, um einen möglichst starken Einfluss des pH-Werts zu simulieren.

Für die Untersuchung wurden alle Wasserstoffbrücken, die im Verlauf der Simulation zwischen der Pro-Domäne und der katalytischen Domäne, sowie alle Wasserstoffbrücken, die innerhalb des Propeptids ausgebildet wurden und keine reinen *backbone*-Interaktionen sind, aufgelistet und nach ihrer prozentualen Häufigkeit sortiert. Dabei wurden nur WW mit einer maximalen Distanz von 3 Å und einem Winkel von ± 20 ° betrachtet, welche zu mindestens 3% der Simulationszeiten auftraten.

Anschließend wurde gezielt nach Interaktionen gesucht, bei denen sich eine deutliche pH-Wert-Abhängigkeit vermuten ließ.

3.3.4 Beschreibung der MD-Simulationen

Im Folgenden wird zunächst das Verhalten der gesamten Struktur während den MD-Simulationen beschrieben. Auf das Verhalten und die WW einzelner AS des Propeptids und der katalytischen Domäne wird in den nachfolgenden Kapiteln eingegangen.

In Abbildung 52 sind die $C\alpha$ -RMSD-Werte, welche die Strukturen zu den jeweiligen Zeitpunkten in Bezug zu ihrer Startstruktur aufwiesen, gegen die Zeit aufgetragen. Dabei wird deutlich, dass es in allen Simulationen zunächst zu einem starken Anstieg des RMSD-Werts innerhalb des 5 ns Equilibrierungszeitraums kam. Anschließend konnte eine Stabilisierung der Strukturen beobachtet werden, wodurch nur noch geringe Schwankungen der RMSD-Werte auftraten.

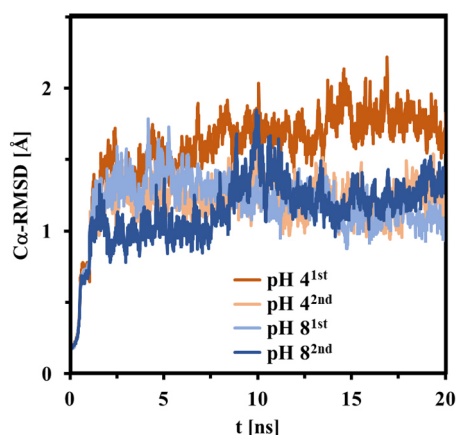


Abbildung 52: $C\alpha$ -RMSD-Werte der Pro-Rhodesain-Struktur in Bezug zur Ausgangsstruktur während der vier MD-Simulationen.

In der Auftragung der $C\alpha$ -RMSD-Werte einzelner Aminosäuren gegen ihre jeweilige Nummerierung wird

ersichtlich, an welcher Stelle des Proteins die größten strukturellen Änderungen während der Simulationen auftraten (siehe Abbildung 53 A). In dieser Auftragung lässt sich erkennen, dass die Strukturen aller Simulationen ein ähnliches Verhalten aufwiesen. Dabei waren die größten Abweichungen von der Startstruktur in der Nähe der N- und C-Termini zu finden. Weiterhin zeigten sich hohe $C\alpha$ -RMSD-Werte innerhalb aller α -Helices des Propeptids ($^{\text{Pro}}\text{Leu18} - ^{\text{Pro}}\text{Lys28}$; $^{\text{Pro}}\text{Asp35} - ^{\text{Pro}}\text{Glu48}$; $^{\text{Pro}}\text{Asp72} - ^{\text{Pro}}\text{Arg95}$) und der Linker-Region zwischen der Pro-Domäne und der katalytischen Domäne ($^{\text{Pro}}\text{Asn101} - ^{\text{Pro}}\text{Ala107}$). Innerhalb der katalytischen Domäne ergaben sich nur für einzelne AS größere Werte. Bei diesen AS handelt es sich um Asp163 – Asp166 und Tre262 – Glu264, welche sich in flexiblen *loop*-Regionen befinden.

Da der RMSD-Wert nur den direkten Vergleich zu einer bestimmten Startstruktur liefert, wurde der $C\alpha$ -*root-mean-square-fluctuation* (RMSF)-Wert einzelner Aminosäuren gegen ihre Nummerierung im Protein aufgetragen (siehe Abbildung 53 B). Dabei gibt der RMSF-Wert den durchschnittlichen RMSD-Wert im Verlauf der Simulation an und kann somit als ein Maß für die Dynamik der einzelnen Aminosäuren interpretiert werden. Wie in der Auftragung der $C\alpha$ -RMSD-Werte (Abbildung 53 A) konnten auch in dieser Auftragung (Abbildung 53 B) keine gravierenden Dynamikunterschiede zwischen den Simulationen bei verschiedenen pH-Werten festgestellt werden.

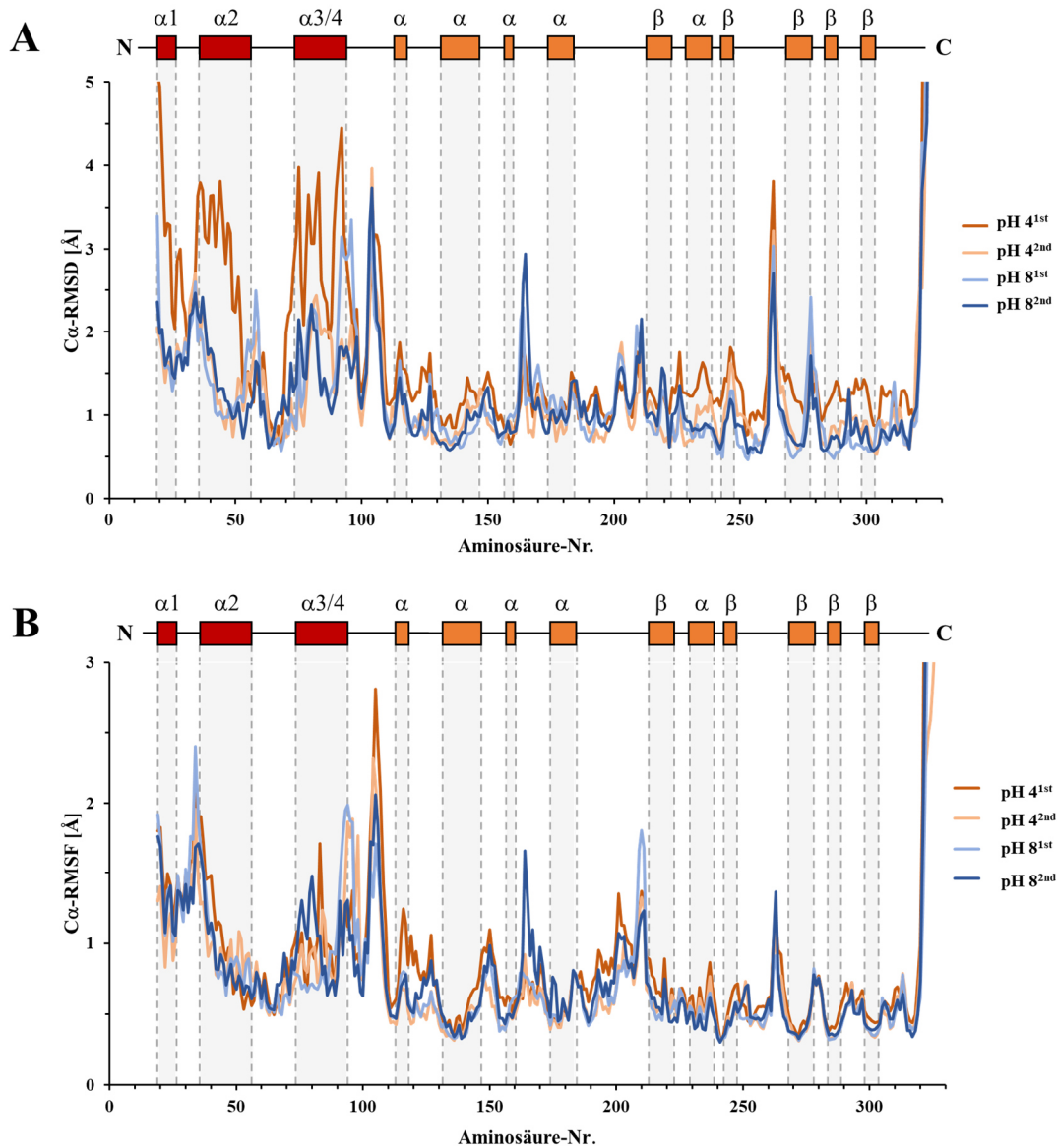


Abbildung 53: Die C_{α} -RMSD- und C_{α} -RMSF-Plots der MD-Simulationen zur Identifizierung der dynamischsten Bereiche des Pro-Rhodesains. C_{α} -RMSD-Werte (A) und C_{α} -RMSF-Werte (B) der einzelnen Aminosäuren in den unterschiedlichen MD-Simulationen sind gegen ihre jeweilige Nummerierung aufgetragen. Die zugehörige Sekundärstruktur ist oberhalb der Plots schematisch dargestellt, wobei die Bereiche des Propeptids in Rot und die der katalytischen Domäne in Orange abgebildet sind.

In allen Simulationen befanden sich die dynamischsten Bereiche an den N- und C-Termini der Struktur. Zudem wirkte die katalytische Domäne, mit Ausnahme einiger *loop*-Regionen, grundsätzlich rigider als die Pro-Domäne, was in Einklang mit den B-Faktor-Werten der Pro-Rhodesain-Kristallstruktur steht (siehe Abbildung 35). Innerhalb der Pro-Domäne zeigten sich besonders flexible Bereiche in Helix 1 einschließlich des N-Terminus der Helix 2. Der C-terminale Teil von Helix 2 und die anschließende *loop*-Region, welche in Kontakt mit dem *propeptide binding loop* (PBL) der katalytischen Domäne steht, scheinen hingegen rigide zu sein. Eine deutliche Dynamik lässt sich auch am C-Terminus der Helix 3/4 erkennen, welche als *blocking peptide* fungiert. Zuletzt befindet sich ein stark dynamischer

Bereich in der Linker-Region (^{Pro}Asn101 – Pro108) zwischen katalytischer und Pro-Domäne, welcher die postulierten *trans-cleavage site* einschließt. Ausschließlich in dieser Region lässt sich eine leichte pH-Abhängigkeit erkennen, da beide Simulationen bei pH 4.0 höhere RMSF-Werte als die Simulationen bei pH 8 aufweisen. Dennoch ist auch diese Region unter basischen Bedingungen dynamisch.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass keine weiteren pH-Abhängigkeiten beobachtet werden konnten, ist, dass große Konformationsänderungen im Mikro- bis Millisekundenmaßstab stattfinden. Sollte eine Änderung des Protonierungszustandes zu solch einer Änderung führen, wäre sie in den Simulationen nicht zu beobachten gewesen, da diese nur 20 ns umfassten.

3.3.5 Ergebnisse der MD-Simulationen bezogen auf die Interaktionen einzelner Aminosäuren

Um Anhaltspunkte für mögliche Wechselwirkungen zu erhalten, welche als pH-sensitive Trigger der Autoaktivierung dienen könnten, wurden die Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäure-Seitenketten hinsichtlich ihrer Häufigkeit untersucht. Dabei waren vorrangig Interaktionen von Interesse, deren Häufigkeit durch eine pH-Wert-Änderung stark beeinflusst wurden. Zunächst wurde zwischen Interaktionen, die zwischen Pro-Domäne und katalytischer Domäne, und Interaktionen, die innerhalb des Propeptids ausgebildet werden, unterschieden. Als Mindestmaß für relevante Interaktionen wurde eine Häufigkeit von mindestens 3% festgelegt. Alle Interaktionen, die eine Häufigkeit unterhalb dieser Grenze aufwiesen, wurden nicht detailliert betrachtet. Eine vollständige Liste der Interaktionen und deren Häufigkeit ist im Anhang aufgeführt.

Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen zwischen Pro-Domäne und katalytischer Domäne

Während der MD-Simulationen zeigten die Aminosäuren ^{Pro}Arg95 und ^{Pro}Arg97, welche sich direkt C-terminal zur Helix 4 des Propeptids befinden, ein pH-abhängiges Verhalten (siehe Abbildung 54 und Tabelle 11). Unter basischen Bedingungen bildeten diese in beiden pH 8-Simulationen häufig Wasserstoffbrücken mit den Carboxylatgruppen der Asparaginsäuren Asp175 und Asp223 der katalytischen Domäne aus. Basierend auf den theoretischen pK_a-Werten, lag Asp223 in allen Simulationen deprotoniert vor während Asp175 nur unter basischen Bedingungen deprotoniert war (pK_a(Asp175) = 9.46; pK_a(Asp223) = 3.38). Wie Tabelle 11 zu entnehmen ist, waren die Interaktionen zwischen ^{Pro}Arg95 bzw. ^{Pro}Arg97 und Asp175 in den Simulationen pH 8^{1st} und pH 8^{2nd} vergleichbar häufig vertreten; Asp223 hingegen schien jeweils eines der Arginine zu präferieren. Im Gegensatz dazu traten unter aziden Bedingungen in keiner der Simulationen WW zwischen ^{Pro}Arg95 und einem der Aspartate auf. Obwohl ^{Pro}Arg97 weiterhin mit Asp175 und Asp223 interagierte, hatte sich die Häufigkeit dieser WW drastisch reduziert.

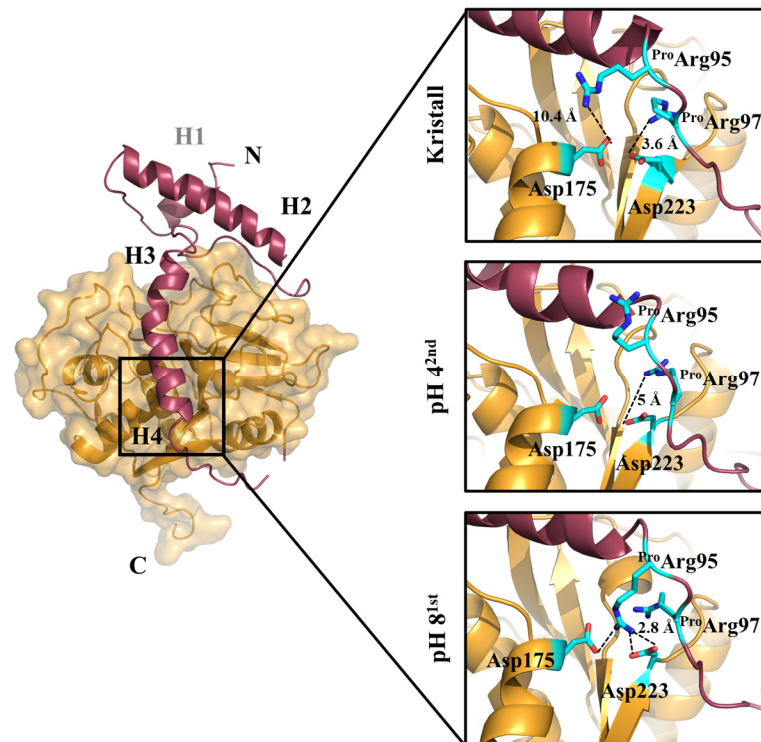


Abbildung 54: Orientierung der AS-Seitenketten von *Pro Arg95*, *Pro Arg97*, *Asp175* und *Asp223* in der Kristallstruktur sowie während des letzten frames der MD-Simulation *4^{2nd}* und *8^{1st}*.

Tabelle 11: Häufigkeit der auftretenden Wechselwirkungen zwischen *Pro Arg95*, *Pro Arg97*, *Asp175* und *Asp223* während der einzelnen MD-Simulationen bei unterschiedlichen pH-Werten.

Interaktion	Häufigkeit	Häufigkeit	Häufigkeit	Häufigkeit
	pH 4 ^{1st}	pH 4 ^{2nd}	pH 8 ^{1st}	pH 8 ^{2nd}
	[%]	[%]	[%]	[%]
<i>Pro Arg95</i> — <i>Asp175</i>	0	0	9.1	15.1
<i>Pro Arg95</i> — <i>Asp223</i>	0	0	21.9	0
<i>Pro Arg97</i> — <i>Asp175</i>	0.2	0.9	19.6	22.1
<i>Pro Arg97</i> — <i>Asp223</i>	3.4	8.0	1.25	52.4

Um zu überprüfen, ob diese Interaktionen spezifisch für Pro-Rhodesain sind, oder es sich um ein konserviertes Motiv innerhalb der CathL-Zymogene handeln könnte, wurde die Pro-Rhodesain-Peptidsequenz mit den Peptidsequenzen anderer trypanosomaler Cathepsin L-Zymogenen und den Peptidsequenzen von gelösten Pro-Cathepsin L-Kristallstrukturen *alignt*. In diesen *alignments* zeigt sich, dass die Aspartate *Asp175* und *Asp223* der katalytischen Domäne von Rhodesain in trypanosomalen Cathepsin L-Proteasen hochkonserviert sind (siehe Abbildung 55 B). Identische oder vergleichbare AS an den entsprechenden Positionen sind auch in den Cathepsin L-Proteasen anderer

Organismen wie bei *T. molitor*, *F. hepatica* oder im Menschen zu finden. Ausnahmen bilden dabei Caricain und Papain aus *C. papaya* und die Cathepsin L-Protease aus *T. dionisii*.

Zudem sind die Aminosäuren ^{Pro}Arg95 und ^{Pro}Arg97 am C-terminalen Ende des *blocking peptide* von Pro-Rhodesain auch in den Propeptiden anderer trypanosomaler Cathepsin L-Zymogene vorhanden (siehe Abbildung 55 A). Allerdings sind vergleichbare AS nicht in den *alignments* mit den CathL-Zymogenen anderer Organismen zu finden. Dies lässt sich möglicherweise auf die hohe Varianz in der Sequenz der *blocking peptides* oder deren Strukturen zurückführen.

Daher wurden die Kristallstrukturen von humanem Pro-CathL (PDB-ID.: 1CJL), *F. hepatica* Pro-CathL (PDB-ID.: 2O6X) und Pro-Caricain (PDB-ID.: 1PCI) mit der Kristallstruktur von Pro-Rhodesain Struktur-alignt (siehe Abbildung 55 C). Dabei fiel auf, dass trotz der Unterschiede in den Sequenzen und Längen der einzelnen *blocking peptides* stets Wechselwirkungen zwischen katalytischer Domäne und Pro-Domäne auftraten, die mit der des Pro-Rhodesains vergleichbar sind. So befinden sich im humanen Pro-CathL die Seitenketten ^{Pro}Arg98, ^{Pro}Lys99 und ^{Pro}Arg101 in räumlicher Nähe zu den sauren Seitenketten der Aspartate Asp184 und Asp227 (siehe Abbildung 55 C, II).

In der Struktur von *F. hepatica* Pro-CathL ist eine Wechselwirkung der basischen ^{Pro}His97 Seitenkette mit der Seitenkette von Glu178, die dem Asp175 in Pro-Rhodesain entspricht, zu erkennen (siehe Abbildung 55 C, I)..

Eine besondere Auffälligkeit ist im *C. papaya* Pro-Caricain zu beobachten, dessen Zymogen einen Polaritäts-*switch* im Vergleich zu Pro-Rhodesain aufweist. So sind die AS ^{Pro}Arg97 und Asp223 von Pro-Rhodesain in Pro-Caricain vertauscht (siehe Abbildung 55 C, III), sodass die WW grundsätzlich bestehen bleiben könnte, es allerdings zu einem Polaritäts-*switch* käme. Dieser *switch* im Pro-Caricain ist nicht nur auf diese Positionen beschränkt, sondern findet sich auch an anderen Kontaktstellen zwischen katalytischer und Pro-Domäne wieder.^[86]

Obwohl die Kristallstruktur von *T. molitor* Pro-CathL (PDB-ID.: 3QT4) im C-terminalen Bereich des Pro-Peptids nicht aufgelöst ist, legt die Peptidsequenz des Zymogens nahe, dass eine WW zwischen ^{Pro}Arg89 und den Aspartat-Seitenketten Asp168 und Asp210 möglich sein könnte.

Ausnahmen bilden somit Pro-Papain und Pro-CathL aus *T. dionisii*, bei denen weder Sequenz noch Struktur einen Hinweis auf eine polare WW zwischen dem *blocking peptide*-C-Terminus und der katalytischen Domäne geben.

Dennoch könnte es sich bei diesen Wechselwirkungen um eine Eigenschaft handeln, über welche viele Organismen die pH-abhängige Aktivierung ihrer Cathepsin L-Zymogenen regulieren.

A

Organismus	PDB-ID	H 3	H 4	
1 <i>T.b. rhodesiense</i>	----	AN----	PYATFGVTPFSDMTREEFRARYRNGASYFAAAQKRL--RKTVNVTTGR	125 (106)
2 <i>T. cruzi</i>	----	AN----	PHATFGVTPFSDLTREEFRSRYHNGAAHFAAAQERA--RVPVKVEVVG	122
3 <i>T.b. equiperdum</i>	----	AN----	PYATFGVTPFSDMTREEFRARYRNGASYFAAAQKRL--RKTVNVTTGR	125
4 <i>T.b. gambiense</i>	----	AN----	PYATFGVTPFSDMTREEFRARYRNGASYFAAAQKRL--RKTVNVTTGR	79
5 <i>T. congolense</i>	----	AN----	PYATFGVTRFSDMSPEEFRATYHNGAEYAAALKRP--RKVVNVSTGK	125
6 <i>T. vivax</i>	----	AN----	PHATFGVTPFSDLTPEEFRTRYHNGERHFEAARGRV--RTLQVQVPGK	118
7 <i>T. dionisii</i>	----	AN----	PHATFGVTPFSDLTREEFRSRHHSAAHFAAAGRKA--RVPVDVGVGD	113
8 <i>T. theileri</i>	----	AN----	PHAMFGVTRFSDLTREEFRQRYINGEAYFKMAERRL--RRPVEVPAGN	121
9 <i>H. sapiens</i>	1CJL	EYREGKHSFTMAMNAFGDMTSEEFRQVMNGFQNRKPRKGVFQEP	----	FYE 113 (113)
10 <i>C. papaya</i> (Caricain)	1PCI	KN----	NSYWLGLNEFADLSNDEFNEKYVGLIDATIE-QS-YDEEFINEDTVN	133 (133)
11 <i>C. papaya</i> (Papain)	4QRX	KN----	NSYWLGLNVFADMSNDEFKEKYTGSIAGNYTTTEL-SYEEVLNDGDVN	134
12 <i>F. hepatica</i>	2O6X	RHDLGLVTYTLGLNQFTDMTFEEFKAKYLT---	EMSRASDILSHGVPYEANNRA	115 (107)
13 <i>T. molitor</i>	3QT4	KFEKGEVTYSKAMNQFGDMSKEEFLAYVNRGKAQKPKHPENL--	RMPYVSSKKP	107

B

Organismus	PDB-ID		
1 <i>T.b. rhodesiense</i>	----	LMDNAFNWIVNSNGGNVFTEASYPYVSGNGEQPCQMNGHEIGAAITDHF	DLP 244 (225)
2 <i>T. cruzi</i>	----	LMNNAFEWIVQENNGAVYTEDSYPYASGEGISPPCTTSGHTVGGATITGHV	ELP 241
3 <i>T.b. equiperdum</i>	----	LMDNAFNWIVNSNGGNVFTEASYPYVSGNGEQPCQMNGHEIGAAITDHF	DLP 244
4 <i>T.b. gambiense</i>	----	LMDNAFNWIVNSNGGNVFTEASYPYVSGNGEQPCQMNGHEIGAAITDHF	DLP 198
5 <i>T. congolense</i>	----	LMDDAFKWIVSSNKNVTFEQSYPYASGGNVPTCDKSGKVVGAKIRDHV	DLP 244
6 <i>T. vivax</i>	----	LMNNAFEWIVKENSNGKVVYTESYPYVSGGEEPPCKPRGHKVGATITGHV	DIP 237
7 <i>T. dionisii</i>	----	LMNSAFEWIVEHHNGTVYTESYRYASGDGIAQPCRTSGRTVGAVITGHV	KLP 241
8 <i>T. theileri</i>	----	LMDNAFKWLVDSNKGKVVYTESYPYVSGSGQTPACSTSEHEVGATVTFGV	DLP 240
9 <i>H. sapiens</i>	1CJL	LMDYAFQYVQD--NGGLDSEESYPYEATE---ESCKYNPKYSVANDTGFV	DIP 229 (229)
10 <i>C. papaya</i> (Caricain)	1PCI	YPPYALEYVAK--N-GIHLRSKYPYKAKQ---GTCRAKQVGGPIVKTSGVGRVQ	246 (246)
11 <i>C. papaya</i> (Papain)	4QRX	YPSALQLVAQ--Y-GIHYRNTYPYEGVQ---RYCRSREKGPYAAKTGDRVQVQ	247
12 <i>F. hepatica</i>	2O6X	LMENAYQYLKQ--F-GLETSSYPYTAVE---GQCRYNKQLGVAKVTGYV	TVH 222 (214)
13 <i>T. molitor</i>	3QT4	WMDSAFSYIHD--Y-GIMSESAYPYEAQG---DYCRFDSSQSVTTLSGGY	DLP 230

C

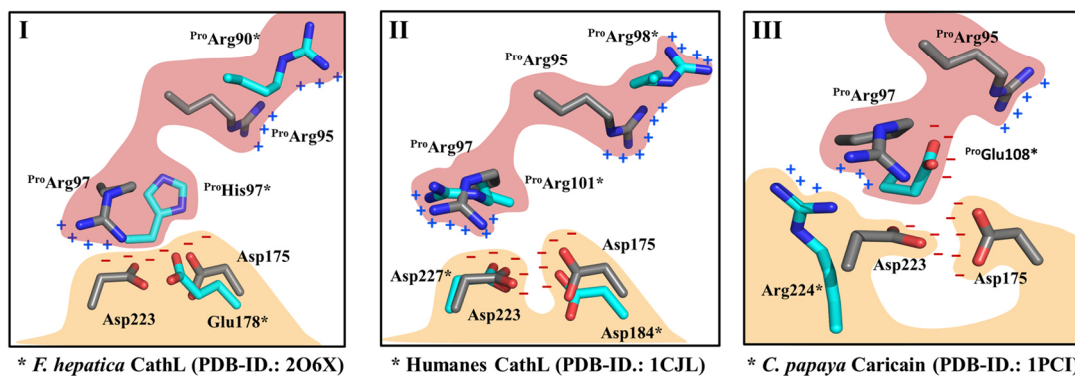


Abbildung 55: Sequenz- und Struktur-alignment von Pro-Rhodesain mit anderen CathL-Zymogenen. (A) Ausschnitt des Peptidsequenz-alignments von Pro-Rhodesain im Bereich des Propeptids. Der Bereich der Helix 3 ist hellgrau, der Bereich der Helix 4 dunkelgrau und der C-terminale Teil der Helix 4, in welchem sich die AS ^{Pro}Arg95 und ^{Pro}Arg97 befinden, orange hervorgehoben. Die Nummerierungen beziehen sich auf die Volllänge-Proteine im jeweiligen Organismus, die Nummerierung anhand der Kristallstrukturen sind in Klammern angegeben. (B) Ausschnitt des Peptidsequenz-alignments von Pro-Rhodesain im Bereich der katalytischen Domäne. Die Aspartate Asp175 und Asp223 des Pro-Rhodesains und die entsprechenden AS in Pro-Cathepsinen anderer Organismen sind in Cyan unterlegt. Aminosäuren, bei denen es sich nicht um Asp oder Glu handelt, sind zudem rot hervorgehoben. Die Nummerierungen beziehen sich auf die Volllänge-Proteine im jeweiligen Organismus, zudem sind die Nummerierungen anhand der Kristallstrukturen in Klammern angegeben. (C) Struktur-alignment von Pro-Rhodesain mit den Kristallstrukturen von *F. hepatica* Pro-CathL (I), humanem Pro-CathL (II) und *C. papaya* Caricain (III). ^{Pro}Arg95, ^{Pro}Arg97, Asp175 und Asp223 von Pro-Rhodesain sind in Grau dargestellt. Vergleichbare AS aus den übrigen Strukturen sind in Cyan angezeigt und die Bezeichnung mit (*) markiert. Die Bezeichnungen der AS beziehen sich auf ihre Nummerierungen in den jeweiligen Kristallstrukturen. Zudem sind die Bereiche der katalytischen Domänen orange und die der Pro-Domänen rot unterlegt.

Wechselwirkungen innerhalb der Pro-Domäne

Bezüglich der Interaktionen, welche ausschließlich innerhalb der Pro-Domäne ausgebildet wurden, fiel besonders die WW zwischen den Aminosäuren ^{Pro}Glu76 und ^{Pro}Arg83, welche sich an den N-Termini der Helix 3 und Helix 4 befinden, auf (Tabelle 12). Die Seitenketten dieser Aminosäuren interagierten in den Simulationen bei pH 8 mit einer Häufigkeit von über 30%, wohingegen in den pH 4-Simulationen keine WW beobachtet wurde. Dies lässt sich anhand von Abbildung 56 erkennen, in welcher die Bereiche zwischen Helix 3 und 4 in der Kristallstruktur und den letzten *frames* der pH 4^{1st} und der pH 8^{2nd}-MD-Simulationen vergrößert dargestellt sind. In der Kristallstruktur, welche unter sauren Bedingungen erhalten wurden, und der Simulation bei pH 4^{1st} bestehen große Distanzen zwischen den Seitenketten von ^{Pro}Glu76 und ^{Pro}Arg83 (8.2 Å bzw. 14.8 Å). Im Gegensatz dazu ist im letzten *frame* der pH 8^{2nd}-Simulation eine Distanzverringering auf 2.7 Å, sowie eine Orientierung der Seitenketten zueinander zu erkennen.

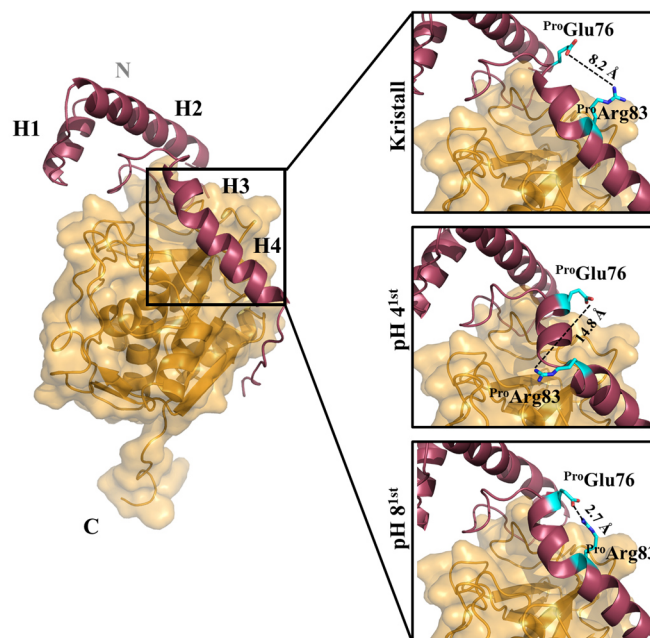


Abbildung 56: Die Wechselwirkung zwischen ^{Pro}Glu76 und ^{Pro}Arg83 zeigt in den MD-Simulationen von Pro-Rhodesain ein pH-sensitives Verhalten. Während die ^{Pro}Glu76- und die ^{Pro}Arg83-Seitenketten im letzten *frame* der pH 8^{1st}-MD-Simulation zueinander orientiert sind, befinden sich diese während des letzten *frames* der pH 4^{1st}-Simulation und in der Kristallstruktur in zu großer Distanz um eine H-Brücken-Interaktion einzugehen.^[156]

Tabelle 12: Häufigkeit der auftretenden Wechselwirkungen zwischen ^{Pro}Glu76 und ^{Pro}Arg83 des Pro-Rhodesains während der einzelnen MD-Simulationen bei unterschiedlichen pH-Werten.

Interaktion	Häufigkeit	Häufigkeit	Häufigkeit	Häufigkeit
	pH 4 ^{1st}	pH 4 ^{2nd}	pH 8 ^{1st}	pH 8 ^{2nd}
	[%]	[%]	[%]	[%]
^{Pro} Glu76— ^{Pro} Arg83	0	0	34.1	71.9

Zudem wurde die Interaktion zwischen der ^{Pro}Arg42-Seitenkette des ER(A/V)FNAA-Motivs und ^{Pro}Glu77 der Helix 3 untersucht, da diese WW bereits als pH-sensitiver Trigger der Autoaktivierung von humanem Pro-CathK und Pro-CathL postuliert wurde.^[87] Allerdings blieb die Interaktion zwischen den Seitenketten von ^{Pro}Arg42 und ^{Pro}Glu77 in allen Simulationen mit einer Häufigkeit von >30% erhalten (siehe Tabelle 13). Eine pH-Abhängigkeit dieser WW konnte somit nicht beobachtet werden.

Ein vergleichbares Resultat ergab sich für die Interaktion zwischen den Seitenketten von ^{Pro}Tyr33 und ^{Pro}Asp72, welche ebenfalls als pH-sensitiver Trigger für die Autoaktivierung in Papain postuliert wurde.^[85] Die Interaktion dieser Seitenketten blieb jedoch in allen Simulationen mit einer Häufigkeit von >60% erhalten (siehe Tabelle 13). Diese Ergebnisse sind möglicherweise auf die theoretischen pK_a-Werte von ^{Pro}Glu77 (pK_a = 3.85) und ^{Pro}Asp72 (pK_a = 2.03) zurückzuführen, wodurch die sauren AS-Seitenketten in allen Simulationen deprotoniert vorlagen.

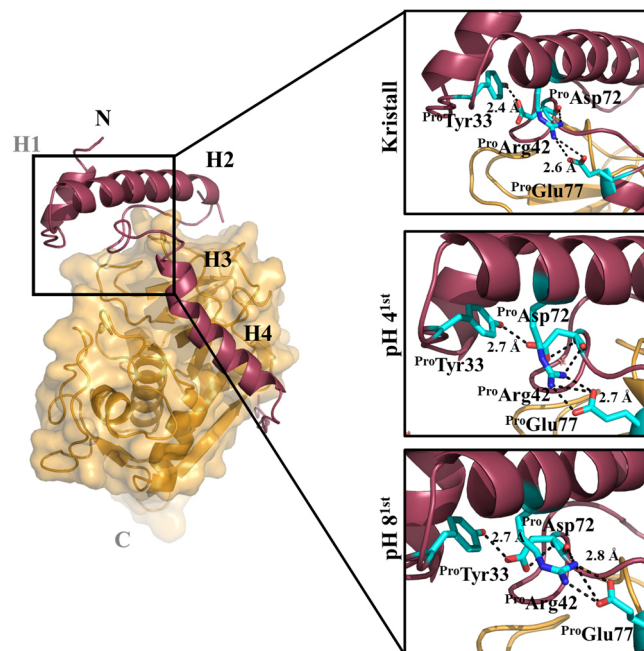


Abbildung 57: Charakteristische WW innerhalb des Propeptids der CathL-Familie bleiben auch in Simulationen bei pH 4 erhalten. Der Bereich, in dem die Wechselwirkungen zwischen ^{Pro}Tyr33 mit dem ^{Pro}Asp72 (GNFD-Motiv) und die des ^{Pro}Arg42 (ER(A/V)FNAA-Motiv) mit ^{Pro}Glu77 (H3) ausgebildet werden, ist hervorgehoben und für den letzten frame der pH 8^{1st}-, der pH 4^{1st}-Simulation, sowie für die Kristallstruktur vergrößert dargestellt.

Tabelle 13: Häufigkeit der auftretenden Wechselwirkungen zwischen ^{Pro}Arg42 und ^{Pro}Glu77 des Pro-Rhodesains während der einzelnen MD-Simulationen bei unterschiedlichen pH-Werten.

Interaktion	Häufigkeit	Häufigkeit	Häufigkeit	Häufigkeit
	pH 4 ^{1st}	pH 4 ^{2nd}	pH 8 ^{1st}	pH 8 ^{2nd}
	[%]	[%]	[%]	[%]
^{Pro} Arg42 – ^{Pro} Glu77	86.0	66.5	33.9	81.7
^{Pro} Tyr33 – ^{Pro} Asp72	68.9	70.0	67.0	76.1

3.3.6 Mutationsstudien zur Untersuchung möglicher pH-sensitiver Trigger

Basierend auf den MD-Simulationen wurde für verschiedene WW ein pH-abhängiges Verhalten vorhergesagt. Ob diese WW einen Einfluss auf die pH-Abhängigkeit des Autoaktivierungsprozesses ausüben, wurde durch Mutationsstudien an aktiven und inaktiven Rhodesain-Konstrukten überprüft. Bei den eingeführten Mutationen handelte es sich zum einen um eine D175N-D223N-Doppelmutation und zum anderen um eine E237A-Einfachmutation.

Erstere basierte auf den Ergebnissen der unter 3.3.3 beschriebenen MD-Simulationen, in welchen stark pH-abhängige WW der Aspartate Asp175 und Asp223 mit den Argininen der Pro-Domäne ^{Pro}Arg95 und ^{Pro}Arg97 auftraten. Zudem stellen diese Interaktionen ein wiederkehrendes Motiv in anderen CathL-Zymogenen dar. Die Aspartate Asp175 und Asp223 wurden zu nicht-deprotonierbaren Asparaginen mutiert, um die ionischen WW aufzuheben, ohne größere sterische Änderungen im Enzym zu verursachen und gleichzeitig die Wasserstoffbrücken-Donorfunktion einer Carbonsäure zu imitieren (siehe Abbildung 58).

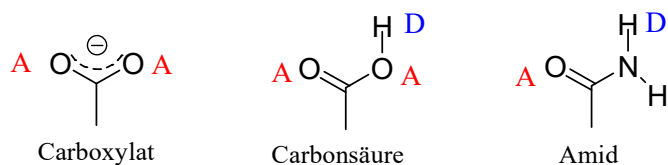


Abbildung 58: Strukturformeln einer Carboxylat-, einer Carbonsäure- und einer Amidgruppe. Die Wasserstoffbrückendonator- (D) bzw. -akzeptorfunktionen (A) der einzelnen Gruppen sind angegeben.

Des Weiteren wurde die Auswirkung der E237A-Einfachmutation untersucht. Die Wahl dieser Mutante beruht auf der Annahme, dass die Carboxylatgruppe des Glu237 unter basischen Bedingungen deprotoniert vorliegt und somit eine WW mit der ^{Pro}Arg106-Seitenkette der Pro-Domäne eingehen könnte. Da ^{Pro}Arg106 während eines *trans-cleavage*-Prozesses die S1-Tasche des hydrolysierenden Rhodesains besetzen müsste, könnte eine solche WW die Seitenkette des Arginins maskieren, sodass dieses nicht mehr für die Substraterkennung zur Verfügung steht (siehe Abbildung 59).

Zudem wies der Bereich nahe der postulierten *trans-cleavage site* in den MD-Simulationen eine pH-abhängige Dynamik auf, welche unter sauren Bedingungen verstärkt wurde (3.3.4 und 3.3.5). Allerdings konnte eine Interaktion zwischen Glu237 und ^{Pro}Arg106 nur mit einer Häufigkeit von 7% in einer MD-Simulation bei pH 8^{2nd} beobachtet werden, während sie in anderen Simulationen nicht vertreten war.

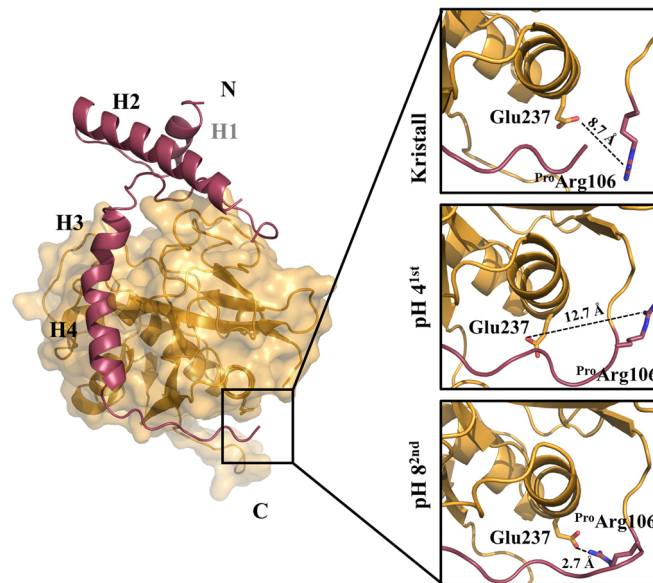


Abbildung 59: Wechselwirkungen zwischen *ProArg106* und *Glu237* in der Pro-Rhodesain-Struktur während des letzten frames der *pH 8^{2nd}* MD-Simulation und des letzten frames der *pH 4^{1st}* MD-Simulation sowie in der Kristallstruktur.

Mutationsstudien bezüglich des *trans-cleavage*-Prozesses

Die Auswirkungen der D175N-D223N-Mutationen sowie der E237A-Mutation auf den *trans-cleavage*-Prozess wurden, wie unter 3.3.1 beschrieben, mit Hilfe eines Gel-*shift*-Assays untersucht. Dazu wurden die Mutationen in inaktives Pro-Rhodesain-C131A eingeführt und die Mutanten bei verschiedenen pH-Werten mit einer geringen Menge an aktivem *mature* Rhodesain versetzt. Den Ansätzen wurden in definierten Intervallen Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert.

Wie aus den Graphen in Abbildung 60 hervorgeht, ergab sich für den *trans-cleavage* Prozess aller drei Mutanten des Pro-Rhodesains eine ähnliche pH-Abhängigkeit. Dabei war mit sinkendem pH-Wert eine Beschleunigung des Umsatzes von inaktivem Pro-Rhodesain zu beobachten. Eine Ausnahme bildet die Prozessierung der E237A-Mutante, bei welcher der *trans-cleavage*-Prozess bei pH 5.5 und 4.0 zunächst gleichmäßig verlief, bevor sich ab Zeitpunkt $t = 2$ h zwei unterschiedliche Plateaus einstellten. Diese Beobachtung könnte sich durch einen Proteinniederschlag erklären lassen, welcher bei pH 4.0 zu beobachten war. Durch das Ausfallen des Substrat-Proteins könnte dieses schwerer zugänglich für das aktive Enzym gewesen sein, weshalb es zu keinem weiteren Umsatz kam.

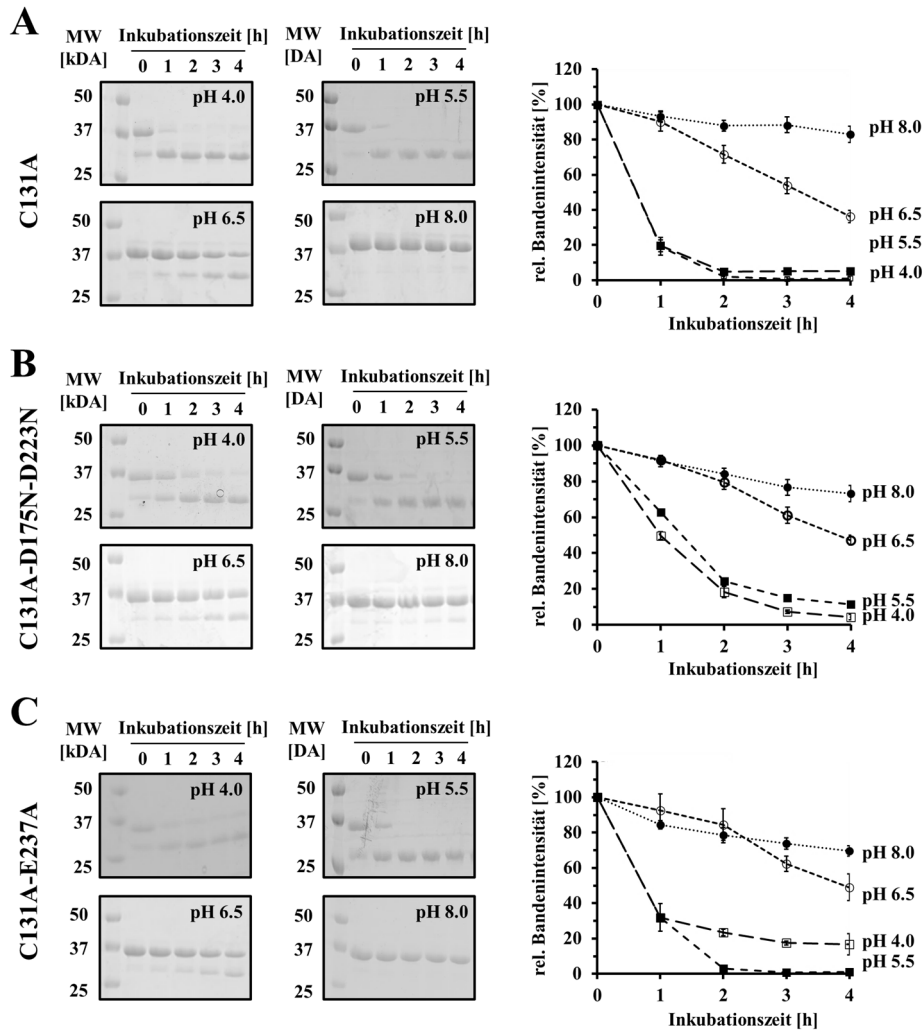


Abbildung 60: Gel-shift-Assays zur Untersuchung der Einflüsse ausgewählter Mutanten auf den trans-cleavage-Prozess. Die inaktiven Pro-Rhodesain-Mutanten C131A (A), C131A-D175N-D223N (B) und C131A-E237A (C) wurden bei den pH-Werten 4.0, 5.5, 6.5 und 8.0 mit reifem WT-Rhodesain versetzt und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mittels SDS-PAGE analysiert. Die Prozessierung der Pro-Rhodesain-Mutanten durch WT-Rhodesain wurde anhand der Intensität der Pro-Rhodesain-Banden bei ~37 kDa verfolgt. Die Intensitäten wurden durch das Programm Image J bestimmt und relativ zu den jeweiligen Zeitpunkten t_0 gesetzt. (links) Beispiele der erhaltenen 15%igen SDS-PAGE-Gele (eine Liste der ausgewerteten Gele befindet sich im Anhang). (rechts) Auftragungen der relativen Pro-Rhodesain-Bandenintensitäten gegen die Inkubationszeit mit WT-Rhodesain.

In der Abbildung 61 sind die direkten Vergleiche der einzelnen Mutanten bei unterschiedlichen pH-Werten dargestellt. Wie zu erkennen ist, zeigen alle drei Mutanten ein ähnliches Verhalten bei pH 8 und 6.5. Unterschiede lassen sich erst bei einem pH-Wert von 5.5 erkennen, bei welchem die Einführung der D175N-D223N-Mutationen zu einer Verlangsamung der Prozessierung führte. Durch den Verlust der ionischen WW zwischen den AS ^{Pro}Arg95, ^{Pro}Arg97, Asp175 und Asp223 wurde eine Lockerung der Pro-Domäne und somit ein beschleunigter Umsatz vermutet. Die Beobachtung, dass diese Mutationen hingegen zu einer Verlangsamung des Prozesses führen, lässt sich daher schwer interpretieren.

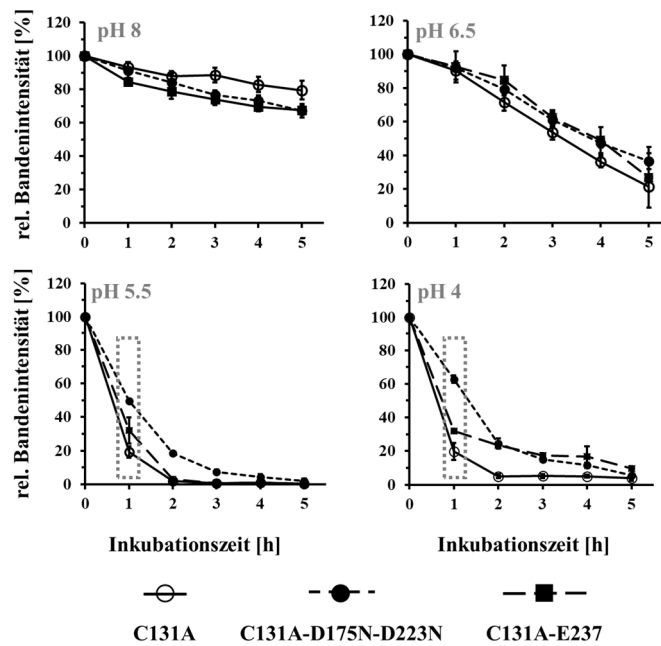


Abbildung 61: Vergleich der Prozessierungen von inaktiven Pro-Rhodesain-Mutanten bei unterschiedlichen pH-Werten. Dargestellt ist die Auswertung der Gel-shift-Assays der Prozessierung der Pro-Rhodesain-Mutanten C131A, C131A-E237A und C131A-D175N-D223N durch aktives mature Rhodesain bei pH 4.0, 5.5, 6.5 und 8.0. Die Intensitäten der Pro-Rhodesain-Banden wurden relativ zum jeweiligen Zeitpunkt t_0 betrachtet.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass für keine der eingeführten Mutationen eine Beschleunigung des *trans-cleavage*-Prozesses beobachtet werden konnte, weshalb die entsprechenden WW nur einen geringen Einfluss auf den *trans-cleavage*-Prozess zeigen.

Mutationsstudien bezüglich des Autoaktivierungsprozesses

Obwohl durch das Einführen der D175N-D223N-Mutationen in Pro-Rhodesain-C131A keine Beschleunigung der Umsetzung des „Zymogens“ durch *mature* Rhodesain beobachtet wurde, wurde der Einfluss dieser Mutationen auf den gesamten Autoaktivierungsprozess (welcher auch *cis-cleavage*-Prozesse einschließen könnte) überprüft. Dazu wurden WT-Rhodesain und aktives Rhodesain-D175N-D223N in *E. coli* exprimiert. Die beiden Enzyme wurden unmittelbar nach der Elution von der Ni-NTA-Säule durch die Zugabe von PMSF inhibiert und die Enzymkonzentrationen durch Zugabe von Elutionspuffer angeglichen. Anschließend wurden die pH-Werte 4.0 und 8.0 eingestellt und die Inhibition durch Zugabe von DTT aufgehoben. Die Bestimmung der katalytischen Aktivitäten der beiden Mutanten erfolgte im unmittelbaren Anschluss daran in definierten Zeitintervallen mit Hilfe des fluoreszenzbasierten Enzymassays. In Abbildung 62 sind die relativen katalytischen Aktivitäten der beiden Proteasen (bezogen auf die jeweils gemessene maximale Enzymaktivität) bei den pH-Werten 4.0 und 8.0 gegen die Vorinkubationszeit bei den entsprechenden pH-Werten aufgetragen.

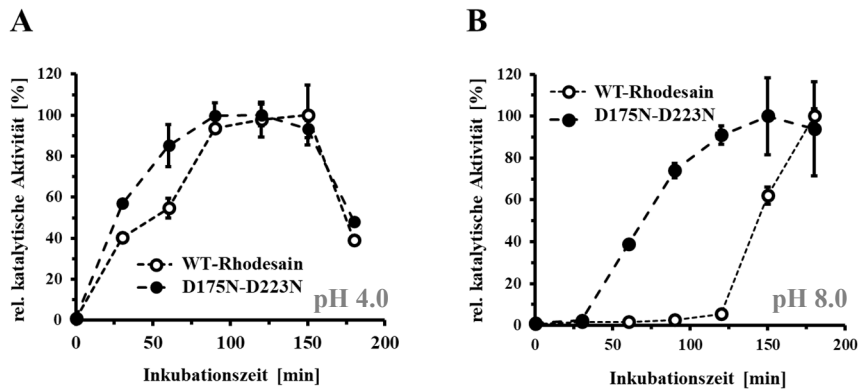


Abbildung 62: Analyse des Einflusses der D175N-D223N-Doppelmutation auf die Autoaktivierung von Rhodesain mittels fluoreszenzbasiertem Enzymassay. Aufgetragen wurden die relativen katalytischen Aktivitäten von WT-Rhodesain und der Rhodesain-D175N-D223N-Mutante nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei pH 4 (A) und 8 (B). Die Aktivitäten wurden auf die höchste gemessene katalytische Aktivität der jeweiligen Mutante normiert.

Wie aus den Graphen hervorgeht, lässt sich bei pH 4.0 kein deutlicher Unterschied in der Aktivierungskinetik der beiden Enzyme erkennen. Sowohl WT als auch Mutante erreichten ihre Aktivitätsmaxima nach ca. 90 min. Nach 180 min Inkubationszeit kam es in beiden Fällen zu einem Verlust der Aktivität, wie er bereits in Abschnitt 3.1.3 beschrieben wurde.

Im Vergleich dazu ergaben sich deutlichere Unterschiede während der Aktivierung bei pH 8.0. Bei diesem pH-Wert ließ sich für die Doppelmutante bereits nach 60 min eine deutliche Zunahme der Aktivität erkennen. Dieser Prozess trat beim WT-Rhodesain erst nach 150 min auf, woraus sich eine Verzögerung von 90 min ergibt. Dies könnte sich durch den Verlust der ionischen WW zwischen den Aminosäuren ^{Pro}Arg95, ^{Pro}Arg97, Asp175 und Asp223 durch die D- zu N-Mutationen erklären lassen, welche zu einer Lockerung der Bindung des Propeptids an die katalytische Domäne führten.

Das Ergebnis, dass die D175N-D223N-Doppelmutation keinen beschleunigenden Einfluss auf den *trans-cleavage*-Prozess in den Gel-*shift*-Assays, wohl aber auf den Autoaktivierungsprozess von aktivem Rhodesain hat, spricht dafür, dass neben dem reinen *trans-cleavage* ein weiterer Prozess an der Reifung von Pro-Rhodesain beteiligt ist.

3.3.7 Das *blocking peptide* als mögliches Substrat

Die Ergebnisse der Mutationsstudien des Abschnitts 3.3.6 sprechen dafür, dass neben dem reinen *trans-cleavage* ein weiterer Prozess an der Autoaktivierung von Pro-Rhodesain beteiligt ist. Bei diesem Prozess könnte es sich um ein *cis-cleavage* handeln, bei welchem es zu einer intramolekularen Hydrolyse des Propeptids kommt. Dieser Prozess müsste aus sterischen Gründen in der Nähe des katalytischen Cysteins und somit nahe des *blocking peptide* geschehen.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde das trypanosomale *blocking peptide* mit WT-Rhodesain versetzt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Als Kontrollen dienten dabei eine Peptid-Lösung ohne Rhodesain bzw. eine Rhodesain-Lösung ohne das Peptid.



Abbildung 63: Sequenz des blocking peptide von Rhodesain sowie die identifizierten Hydrolysestellen durch Rhodesain. Die potenziellen Hydrolysestellen sind durch rote Abtrennungen gekennzeichnet.

Tabelle 14: Detektierte m/z-Verhältnisse des trypanosomalen blocking peptide, welche in LC-MS-Studien vor oder nach der Inkubation mit Rhodesain gefunden wurden, sowie deren mögliche Zuordnungen.

	Ion	m/z _(obs.)	m/z _(theo.)	Sequenz
Kontrolle	[M + 3 H] ³⁺	428.6	428.5	⁺ H ₃ N-RNGASYFAAAQK-CONH ₂
	[M + 2 H] ²⁺	642.3	642.2	⁺ H ₃ N-RNGASYFAAAQK-CONH ₂
Rhodesain + Peptid	[M + 1 H] ⁺	346.0	346.3	⁺ H ₃ N-RNG-COO ⁻
	[M + 1 H] ⁺	417.3	417.4	⁺ H ₃ N-RNGA-COO ⁻
	[M + 1 H] ⁺	486.5	486.5	⁺ H ₃ N-ASYF-COO ⁻
	[M + 1 H] ⁺	487.2	487.6	⁺ H ₃ N-AAAQK-CONH ₂

Wie Tabelle 14 zu entnehmen ist, konnten in der Puffer-Kontrolle der Peptid-Lösung m/z-Verhältnisse detektiert werden, welche einem zweifach bzw. dreifach positiv geladenen Peptid entsprachen und in der Rhodesain/Puffer-Kontrolle nicht detektiert wurden. Daher wurde geschlossen, dass das Peptid unter den verwendeten Pufferbedingungen in Abwesenheit der Protease stabil ist.

In der anschließenden Messung des Rhodesain-Peptid-Gemisches wurden hingegen weder die beschriebenen noch andere m/z-Verhältnisse detektiert, welche dem eines vollständigen Peptids entsprechen. Stattdessen wurden die in Tabelle 14 aufgeführten m/z-Verhältnisse gefunden, welche Fragmenten des *blocking peptide* zugeordnet wurden. Die potenziellen Hydrolysestellen, die sich aus diesen Fragmenten (Fragment 1 = ⁺H₃N-RNGA-COO⁻, Fragment 2 = ⁺H₃N-AAAQK-CONH₂, Fragment 3 = ⁺H₃N-RNG-COO⁻, Fragment 4 = ⁺H₃N-ASYF-COO⁻) ergeben, sind in Abbildung 63 hervorgehoben. Das letzte Peptid-Fragment (Fragment 3 = ⁺H₃N-SYF-COO⁻) konnte jedoch nicht detektiert werden.

Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass es sich bei dem *blocking peptide* um ein Substrat von Rhodesain handelt. Hinsichtlich eines möglichen *cis-cleavage*-Prozesses wurden anhand der Kristallstrukturen die Distanzen zwischen dem katalytischen Cys131 und den Hydrolysestellen berechnet. Diese sind in der nachfolgenden Abbildung 64 dargestellt. Wie zu erkennen ist, weisen die Hydrolysestellen des *blocking peptide* eine Distanz von 8.0, 11.0 und 12.5 Å zum katalytischen Cys131

auf, was einen nukleophilen Angriff des Thiolats im Sinne eines *cis-cleavage* unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Im Hinblick auf eine mögliche *cis*-Aktivierung gilt jedoch weiterhin zu beachten, dass die Kristallstruktur durch eine C131A-Mutante erhalten wurde, wodurch die negative Ladung des Thiolats fehlt. Die Auswirkungen, die der Verlust dieser Ladung auf die Struktur des Propeptids hatte, sind somit unbekannt und könnten zu einer Distanzierung des N-terminalen Teils des *blocking peptide* von der aktiven Tasche geführt haben.

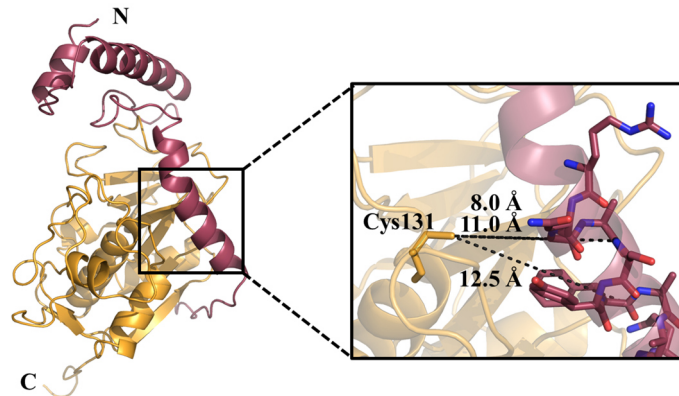


Abbildung 64: Distanzen zwischen katalytischen Cystein 131 und den Hydrolysestellen innerhalb des blocking peptide in der Kristallstruktur von Pro-Rhodesain. Zur Bestimmung des Abstands wurde die Pro-Rhodesain-Kristallstruktur verwendet, in die das katalytische Cys131 nachträglich durch das Programm PyMol eingefügt wurde. Die Aminosäuren des blocking peptide sind als sticks dargestellt und die Distanzen zwischen dem Thiolat des Cys131 zu den möglichen Hydrolysestellen eingezeichnet. Diese befinden sich mit 8.0, 11.0 und 12.5 Å in großer Distanz zum katalytischen Cystein 131.

Wie in Abbildung 64 zu erkennen ist, wurde nur der Trypanosomen-spezifische Bereich (Helix 4) untersucht. Daher ist weiterhin fraglich, ob es innerhalb der Helix 3, welche in der Kristallstruktur einen höheren B-Faktor und damit eine stärkere Flexibilität als H4 besitzt, ebenfalls zu einer Hydrolyse kommen kann.

3.4 Zusammenfassung und Diskussion des Abschnitts 3

Die Struktur von Pro-Rhodesain wurde erstmals mittels Röntgenstrukturkristallographie mit einer Auflösung von 2.8 Å gelöst und stellt damit die erste Zymogen-Struktur einer trypanosomalen Pro-CathL-ähnlichen Protease dar. Dazu wurde die inaktive Pro-Rhodesain-C131A-Mutante kristallisiert, was durch das erfolgreiche Etablieren eines Protokolls zur heterologen Expression von Rhodesain in *E. coli* ermöglicht wurde.

Neben den typischen Charakteristika der CathL-Zymogene, wie konservierte Motive und der Abfolge bzw. Orientierung einzelner Sekundärstrukturen, besitzt die Pro-Domäne von Rhodesain ein *blocking peptide* mit einer für CathL-Zymogene untypischen α -helikalen Sekundärstruktur (Helix 4, H4).

Peptid-BLASTs ergaben weiterhin, dass die Sequenz des *blocking peptide* trypanosomenspezifisch ist, da keine Übereinstimmungen mit Pro-Cathepsinen anderer Spezies gefunden wurden. Die Ausrichtung und Orientierung dieser α -Helix kann als glaubwürdig angesehen werden, da die Elektronendichte des Rückgrats und der aromatischen Seitenketten deutlich zu erkennen ist. Zudem bildet H4 im Kristall nur wenige Kontakte mit anderen Proteinmonomeren aus, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass sie nicht durch die Kristallisation induziert wurde und somit auch im gelösten Pro-Rhodesain existiert. Darüber hinaus wurde die Fähigkeit des trypanosomalen *blocking peptide* α -helikale Strukturen auszubilden mittels CD-Spektroskopie bei unterschiedlichen TFE-Konzentrationen im Gegensatz zum human *blocking peptide* bestätigt.

Weiterhin konnte durch eine Überlagerung der Pro-Rhodesain-Struktur mit der des Rhodesain-K11777-Komplexes (2P7U) gezeigt werden, dass die Aminosäureseitenketten von ^{Pro}Tyr88 und ^{Pro}Phe89 die S3- und S2-Bindetaschen des Enzyms besetzen und somit einen ähnlichen Bindemodus wie der bekannte Inhibitor K11777 aufweisen. Dies steht in Einklang mit der inhibierenden Funktion des Propeptids.

Zudem deutet der geringe $C\alpha$ -RMSD von 0.92 Å des *alignments* von Pro-Rhodesain und *mature* Rhodesain (PDB-ID.: 2P7U) darauf hin, dass die Anwesenheit des Propeptids zu keiner starken strukturellen Änderung der katalytischen Domäne führt.

Allerdings bleibt weiterhin unbekannt, welchen Einfluss die C131A-Mutation und der Verlust der Ladung des Thiolats auf die Struktur des Propeptids haben.

Zu diesen Einflüssen könnte die Besetzung weiterer Substratbindetaschen durch das Propeptid zählen. Beispielsweise ist die S1-Tasche in der Pro-Rhodesain-Struktur unbesetzt, obwohl sich ^{Pro}Arg81 in deren Nähe befindet und Arginin von der S1-Tasche präferiert wird. Der möglicherweise dadurch entstandene Raum wurde in der Kristallstruktur von einem Glycerol-Molekül eingenommen.

Zudem wurde die Pro-Rhodesain-C131A-Mutante unter sauren Bedingungen und somit bei einem pH-Wert kristallisiert, unter welchem die Pro-Domäne autokatalytisch abgespalten wird. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich einige WW, welche nur unter basischen Bedingungen ausgebildet werden, in der Kristallstruktur von Pro-Rhodesain nicht erfassen lassen.

Neben der Struktur des Zymogens wurde auch dessen pH-induzierte Aktivierung durch Abspalten der Pro-Domäne untersucht.

Durch Inkubation der katalytisch inaktiven Pro-Rhodesain-C131A-Mutante mit aktivem WT-Rhodesain konnte nachgewiesen werden, dass die Autoaktivierung über einen pH-abhängigen *trans-cleavage*-Prozess verlaufen kann. Um Wechselwirkungen zu identifizieren, welche diesen pH-abhängigen Prozess kontrollieren, wurden MD-Simulationen von Pro-Rhodesain bei pH 4.0 und 8.0 durchgeführt. Die dabei identifizierten ionischen WW zwischen ^{Pro}Arg95, ^{Pro}Arg97, Asp175 und Asp223 zeigten in den Simulationen ein pH-abhängiges Verhalten. Der Verlust dieser ionischen WW durch das Einführen einer D175N-D223N-Doppelmutation in aktives Pro-Rhodesain, führte zu einer beschleunigten Autoaktivierung bei pH 8.0 im Vergleich zu WT-Pro-Rhodesain. Bei pH 4.0 zeigten WT und Mutante hingegen nahezu identisches Verhalten. Dies deutet darauf hin, dass durch die Mutation WW aufgehoben wurden, welche die pH-Sensitivität der Autoaktivierung beeinflussen und nur unter basischen Bedingungen gebildet werden.

Allerdings führte eine D175N-D223N-Doppelmutation in inaktives Pro-Rhodesain-C131A zu keiner beschleunigten Prozessierung durch aktives *mature* Rhodesain in einem *trans-cleavage*-Prozess. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass neben dem *trans-cleavage* noch ein weiterer Prozess an der Autoaktivierung von Pro-Rhodesain beteiligt ist, welcher durch diese Mutation beeinflusst wurde. Bei diesem Prozess könnte es sich entweder um ein *cis-cleavage* oder um ein Aufklappen der Pro-Domäne handeln.

Eine starke Strukturänderung, wie sie bei einem Aufklappen oder Entfalten der Pro-Domäne zu erwarten wäre, konnte jedoch weder durch CD- noch durch Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden. In PET-FCS-Messungen wurde ebenfalls kein Aufklappen der Pro-Domäne beobachtet, jedoch wurde unter aziden Bedingungen eine Änderung der Dynamik und eine Vergrößerung des hydrodynamischen Radius detektiert. Dies deutet auf eine Lockerung des Propeptids hin. Zudem wurde für die Pro-Rhodesain-Mutante, welche an Cys80 der H3 Fluoreszenz-markiert wurde, eine pH-abhängige Änderung der PET-Kinetik beobachtet. Diese Beobachtung wurde in den Versuchen mit der Pro-Rhodesain-Mutante, welche über Cys32 zwischen H1 und H2 Fluoreszenz-markiert wurde, nicht gemacht. Somit könnte dies ein möglicher Hinweis darauf sein, dass sich pH-Änderungen unterschiedlich auf die Dynamiken einzelner Bereiche der Pro-Domäne auswirken. Dies steht in Übereinstimmung mit der Kristallstruktur, in welcher H3 im Vergleich zum *loop* zwischen H1 und H2 einen höheren B-Faktor aufweist, was auf eine stärkere Dynamik der Helix 3 hindeutet. Eine pH-Sensitivität der Zeitkonstanten und Amplituden der einzelnen PET-Ereignisse wurde jedoch bei allen untersuchten Konstrukten beobachtet.

Zur Untersuchung eines möglichen *cis-cleavage*-Prozesses wurde das isolierte, trypanosomale *blocking peptide* durch Rhodesain hydrolysiert und die entstandenen Peptid-Fragmente massenspektrometrisch analysiert. Die dabei identifizierten Hydrolysestellen wurden mit der Pro-Rhodesain-Kristallstruktur verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Hydrolysestellen eine große Distanz zum aktiven Cystein

besitzen, wodurch ein intramolekularer Angriff des katalytischen Cysteins in einem *cis-cleavage*-Prozess unwahrscheinlich erscheint. Obwohl in einer aktuellen *in vivo*-Studie zur Expression von Rhodesain in *T. brucei* eine Kombination aus *cis*- und *trans-cleavage* Prozessen postuliert wurde, konnte dies in dieser Arbeit nicht eindeutig nachgewiesen werden.^[148]

Dazu ist jedoch weiterhin anzumerken, dass sich noch zusätzliche Hydrolysestellen innerhalb des Propeptids befinden könnten (beispielsweise in H3), welche in dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

Hervorzuheben ist weiterhin, dass die Wechselwirkungen zwischen ^{Pro}Arg95, ^{Pro}Arg97, Asp175 und Asp223 vom C-Terminus des Propeptids zur katalytischen Domäne ausgebildet werden. Dieser Bereich fand in der Literatur bislang nur wenig Beachtung, obwohl vergleichbare Interaktionen auch in anderen Zymogenen der CathL-Familie vorhanden sind. Somit spielen diese Interaktionen möglicherweise auch eine entscheidende Rolle in der Autoaktivierung von Cathelin L-Proteasen anderer Organismen.

In Studien an verwandten CathL-Proteasen wurden die WW zwischen ^{Pro}Asp116 des GNFD-Motivs und ^{Pro}Tyr77 von Papains oder ^{Pro}Arg31 des ERFNIN-Motivs und ^{Pro}Glu70 der H3 in humanem Pro-CathL als pH-sensitive Trigger postuliert.^{[85][87]} Diese Wechselwirkungen zeigten in den MD-Simulationen an Pro-Rhodesain jedoch keine pH-Abhängigkeit. Grund dafür könnten Abweichungen zwischen den berechneten und den wirklichen pK_a-Werten dieser AS-Seitenketten des Pro-Rhodesains sein. Unterschiede in Aktivierungsmechanismen verschiedener CathL-Zymogene lassen sich jedoch ebenfalls nicht ausschließen.

Des Weiteren bleibt fraglich, welche der vier ionischen WW (^{Pro}Arg95, ^{Pro}Arg97, Asp175 und Asp223) zwischen dem C-Terminus des Propeptids und der katalytischen Domäne entscheidend für die pH-sensitive Aktivierung ist.

Somit konnten durch die beschriebenen Untersuchungen neue Einblicke in den Aktivierungsmechanismus von Pro-Rhodesain gewonnen werden, wobei die Kristallstruktur und die Identifikation pH-sensitiver WW weitere Ansätze zur Untersuchung von (trypanosomalen) CathL-Proteasen bieten.

4 Biophysikalische Charakterisierung der Rhodesain-(α -Fluoro-) Vinylsulfon-Bindung

Die Bindung zwischen Liganden und Enzymen wird häufig anhand der Dissoziationskonstante K_D beschrieben und optimiert. Da diese Konstante jedoch nur die Affinität zwischen den Bindungspartnern in einem Gleichgewichtszustand beschreibt, werden kinetische Parameter oft vernachlässigt. Diese besitzen jedoch im Hinblick auf *in-vivo*-Systeme eine höhere Aussagekraft, da ein Gleichgewichtszustand im lebenden Organismus nie erreicht wird.^{[106][107]}

Im nachfolgenden Kapitel wird daher die Bindung von vinylsulfon-basierten Inhibitoren an Rhodesain im Hinblick sowohl auf thermodynamische als auch auf kinetische Parameter analysiert. Dazu wurden verschiedene Methoden wie *isothermal titration calorimetry* (ITC), *microscale thermophoresis* (MST), *surface plasmon resonance spectroscopy* (SPR) und *photoinduced electron transfer-fluorescence correlation spectroscopy* (PET-FCS) bzw. *rapid-mixing*-Experimente angewandt.

4.1 Markierung von Rhodesain

Für die oben genannten Methoden, wie SPR oder MST ist es unentbehrlich Rhodesain auf seiner Oberfläche mittels chemischer Kopplung zu immobilisieren oder mit einem Farbstoff zu markieren. Die chemische Kopplung von Molekülen an Proteine geschieht über reaktive Gruppen an der Proteinoberfläche, bei denen es sich meist um den N-Terminus des Proteins oder Lysin- bzw. Cystein-Seitenketten handelt.^[157]

Ziel dieses Projekts war es, eine Methode zur Markierung von Rhodesain zu etablieren, bei der das Enzym selektiv an einer einzigen Stelle modifiziert wird, ohne dass es dabei seine katalytische Aktivität verliert. Diese Methode sollte genutzt werden, um kinetische oder thermodynamische Parameter der Bindung von Vinylsulfon-basierten Inhibitoren an Rhodesain mittels SPR oder MST zu charakterisieren.

In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits versucht die Protease über Lysin-Seitenketten zu immobilisieren oder mit einem Farbstoff zu markieren.^{[104][145]} Da diese Experimente jedoch erfolglos blieben, wurde eine Markierung über Cystein-Seitenketten versucht. Rhodesain besitzt in seiner aktiven Form sieben Cystein-Reste, von denen jedoch sechs Disulfidbrücken bilden und sich das siebte in der *active site* befindet, welches für die katalytische Aktivität essenziell ist.

Um eine Reaktion des aktiven Cysteins während der Kopplung zu verhindern, wurde sich die inaktive Pro-Form von Rhodesain zu Nutze gemacht, bei welcher das Propeptid schützend über dessen *active site* liegt. Das Pro-Rhodesain konnte durch die in 3.1.3 etablierte Methode zur heterologen Expression von Rhodesain aus *E. coli* gewonnen werden. Dieses Expressionssystem ermöglichte es weiterhin

zusätzliche Cysteine an der katalytischen Domäne durch *site directed mutagenesis* einzuführen, deren Seitenketten dann für die Markierung zur Verfügung stehen. Darüber hinaus wurde das einzige Cystein der Pro-Domäne (Cys3) zu Serin mutiert, um eine unspezifische Reaktion mit dem Propeptid zu vermeiden.

Ausschlaggebend für die Positionierung artifiziieller Cysteine war, dass:

- sie sich im Protein auf der gegenüberliegenden Seite zum katalytischen Zentrum befinden, damit die Markierung oder Immobilisierung nicht zur Blockade des aktiven Zentrums führt,
- sie lösungsmittel exponiert sind, um eine chemische Reaktion an der Proteinoberfläche zu ermöglichen,
- die ausgetauschten Aminosäuren auf Grundlage der Kristallstruktur 2P7U keine Seitenketten-Interaktionen mit anderen Aminosäuren aufweisen, um den Verlust einer essenziellen Wechselwirkung zu vermeiden.

Basierend auf diesen Voraussetzungen wurde Ser279 (Ser173 bezogen auf *mature* Rhodesain) ausgewählt und zu Cystein mutiert.

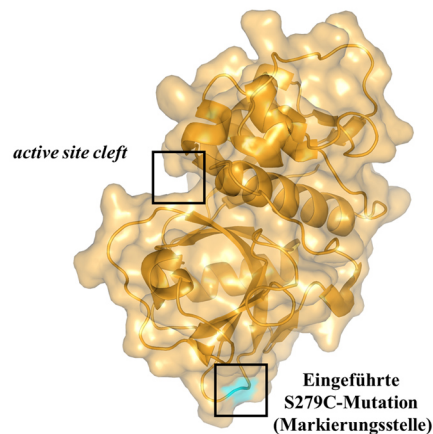


Abbildung 65: Darstellung der Rhodesain-S279C-Mutante, die für Rhodesain-Markierungen verwendet wurde. Die Positionen der active site und der S279C-Mutation (Cyan) wurden hervorgehoben. Die C3S-Mutation befindet sich am N-Terminus des Propeptids und ist in dieser Abbildung nicht dargestellt.

In ersten Markierungsversuchen dieser Mutante wurde ein **Maleimid-Polyethyleneglycol (Mal-PEG)**-Assay durchgeführt, in welchem ein Maleimid-funktionalisiertes, monodisperses PEG definierter Größe (5947 Da) an die C3S-S279C Rhodesain-Doppelmutante gekoppelt wurde.

Dazu wurden die Ni-NTA-Elutionen des Pro-Rhodesain-C3S-S279C-GFP-Fusionproteins mit Mal-PEG in unterschiedlichen Mal-PEG/Enzym-Verhältnissen (Mal-PEG : Protein = 0 : 1; 1 : 1; 5 : 1; 10 : 1, (n : n)) versetzt. Anschließend folgten als weitere Schritte die TEV-katalysierte Abspaltung des GFPs und die Aktivierung des Pro-Rhodesains durch Ansäuern. Um zu überprüfen, ob Rhodesain durch eine Reaktion des aktiven Cysteins mit Mal-PEG irreversibel inhibiert wurde, wurde dessen katalytische

Aktivität im FBE bestimmt (siehe Abbildung 66). In diesem ließ sich kein deutlicher Unterschied in den katalytischen Aktivitäten der einzelnen Ansätze feststellen.

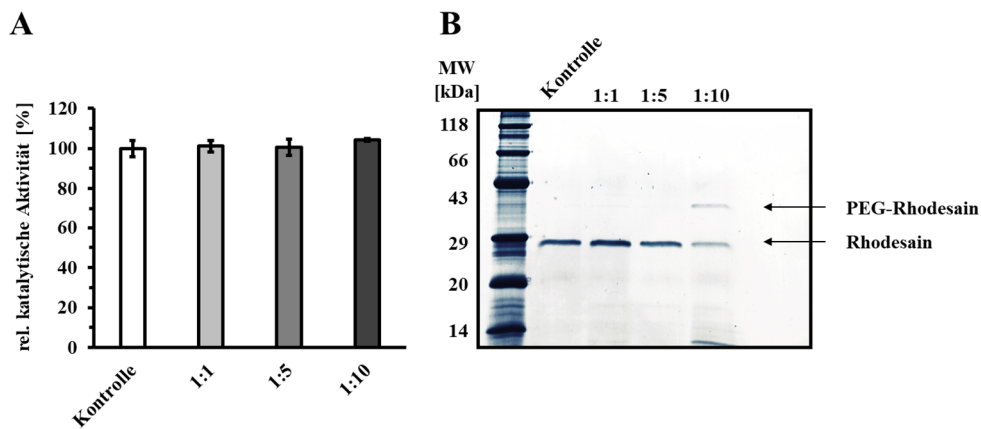


Abbildung 66: Resultate des Mal-PEG-Assays der Markierung von Rhodessain-C3S-S279C. (A) Auftragung der katalytischen Aktivitäten der einzelnen Kopplungsansätze im fluoreszenzbasierten Enzymassay nach vollständiger Aktivierung der Protease. Die maximalen gemessenen katalytischen Aktivitäten der einzelnen Ansätze sind relativ zum Kontrollansatz aufgetragen. (B) 14%iges SDS-PAGE-Gel der verschiedenen Mal-PEG-Rhodessain-Kopplungsansätze nach vollständiger Aktivierung. Aufgetragen wurden der Kontrollansatz, welcher kein Mal-PEG enthielt und die Kopplungsverhältnisse 1 : 1, 5 : 1, 10 : 1 (Mal-PEG : Rhodessain = n : n). Ausschließlich bei einem 10 : 1-Verhältnis lässt sich ein zusätzliches Produkt erkennen, dessen Laufhöhe dem erwarteten Molekulargewicht von einfach PEGyliertem Rhodessain entspricht.

Die Kopplung des Mal-PEGs an Rhodessain wurde mittels SDS-PAGE überprüft (siehe Abbildung 66 A). In allen Spuren des SDS-PAGE-Gels sind ausschließlich Banden des aktiven *mature* Rhodessains unterhalb der 29 kDa-Bande zu erkennen. Die einzige Ausnahme stellt dabei Spur 4 dar, in welcher eine zusätzliche Bande bei 35 – 40 kDa zu erkennen ist. Zusätzlich ist die *mature* Rhodessain-Bande dieser Spur schwächer als in den übrigen Spuren. Der Größenunterschied zwischen der *mature* Rhodessain-Bande und der zusätzlichen Bande deckt sich mit den Größenunterschieden, die in der Literatur bei der PEGylierung anderer Proteine beobachtet wurden.^[158] Daher wurde angenommen, dass es sich bei der zusätzlichen Bande (35 – 40 kDa) um eine Fraktion von einfach PEGyliertem Rhodessain handelt. Da diese Fraktion im FBE eine vergleichbare katalytische Aktivität wie die Kontrolle aufwies, kann davon ausgegangen werden, dass die Markierung selektiv am artifiziellen Cys279 und nicht am katalytischen Cys131 geschah.

Parallel wurden Versuche zur Markierung der S279C-Mutante mit dem Farbstoff Cy5 durchgeführt, um spätere MST-Messungen zu ermöglichen. Hierfür wurde das *Labeling-Kit Cy5* (GE Healthcare, Amersham Maleimide Mono-Reactive Dye) verwendet. Die Konjugation des Cy5s erfolgte über eine Reaktion der Cystein-Seitenkette mit einem Maleimid-Linker des Farbstoffs (siehe Abbildung 67).

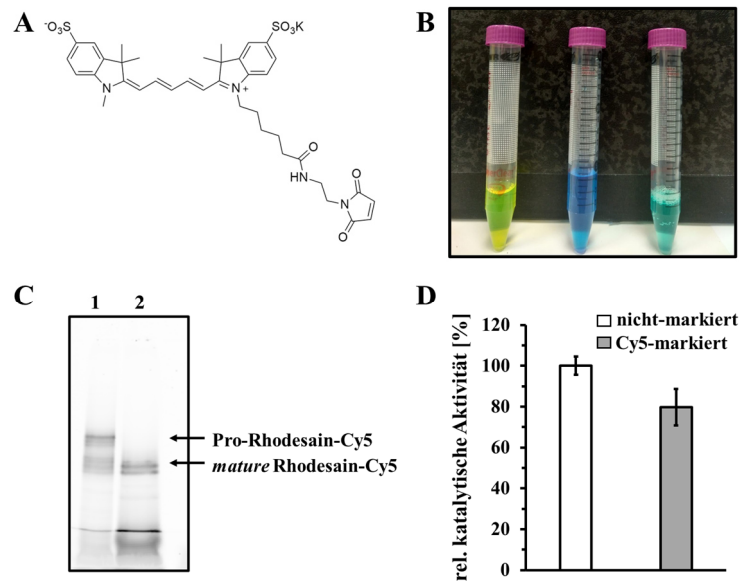


Abbildung 67: Markierung des Pro-Rhodopsin-S279C-GFP mit Cy5. (A) Struktur des Maleimid-Cy5-Farbstoffs. (B) Elutionen der NAP-Säule: (links) Pro-Rhodopsin-GFP vor Zugabe des Cy5-Farbstoffs, (mittig) Elutionsfraktion des freien Farbstoffs, (rechts) Elutionsfraktion des Cy5-markierten Pro-Rhodopsin-S279C-GFP-Konjugates. (C) Aufnahme eines 14%igen SDS-PAGE-Gels von Cy5-markiertem Rhodopsin vor (1) und nach (2) der Aktivierung bei einer Wellenlänge von 649 nm. (D) Katalytische Aktivität von Cy5-markiertem Rhodopsin-S279C und eines unmarkierten Kontrollansatzes im fluoreszenzbasierten Enzymassay. Die Werte sind relativ zur katalytischen Aktivität der Kontrolle aufgetragen.

Die Kopplungsreaktion wurde analog zur Konjugation mit Mal-PEG durchgeführt, wobei überschüssiger Farbstoff durch eine NAP25-Säule (*GE Healthcare*) und das abgespaltene GFP durch *anion exchange chromatography* (AEX) vom farbstoffmarkierten Pro-Rhodopsin abgetrennt wurden.

Eine Markierungseffizienz von 91% wurde photometrisch nach Formel (3) bestimmt.

$$\text{Markierungseffizienz} = \frac{c_{\text{Cy5}}}{c_{\text{Pro-Rhodopsin}}} = \frac{2.9 \cdot A_{650}}{A_{280} - (0.05 \cdot A_{650})} \quad (3)$$

Das Cy5-Pro-Rhodopsin wurde daraufhin vor und nach der Aktivierung mittels SDS-PAGE untersucht. Wie in Abbildung 67 C dargestellt, zeigt die Aufnahme des Gels bei 649 nm, dass die Bande des Pro-Rhodopsins nach der Aktivierung verschwand, während die schwächere Bande des *mature* Rhodopsins deutlich zunahm. Daraus wurde geschlossen, dass das Enzym an der katalytischen Domäne markiert wurde.

Um zu überprüfen, ob der Farbstoff unspezifisch mit dem aktiven Zentrum des Enzyms reagiert hatte, wurden die katalytischen Aktivitäten von markierter und nicht-markierter S279C-Mutante verglichen. Die relative katalytische Aktivität des Farbstoff-markierten Rhodopsins zur nicht-markierten Kontrolle

betrug $79.0 (\pm 11.1)\%$, sodass ca. 20% des Enzyms durch Reaktion des katalytischen Cysteins 131 inaktiviert wurden (siehe Abbildung 67 D).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass Rhodessain erfolgreich mit Cy5-Farbstoff oder Mal-PEG markiert wurde. Dabei behielt das Enzym nach der Markierung mit Cy5 ca. 80% seiner katalytischen Aktivität, während nach der Konjugation mit Mal-PEG kein Aktivitätsverlust festgestellt wurde. Somit wurde eine geeignete Methode zur selektiven Markierung von aktivem Rhodessain etabliert und damit die Grundlage für MST- und SPR-Experimente an Rhodessain geschaffen.

4.2 SPR-Messungen

Die *surface plasmon resonance spectroscopy* (SPR) ist eine Standardmethode zur Bestimmung von kinetischen Konstanten der Bindung von Proteinen und Liganden. In klassischen SPR-Experimenten werden die Proteine zunächst auf der Oberfläche eines SPR-Chips immobilisiert, welcher wiederum in Kontakt mit einer Flusszelle steht. In diesem Aufbau können Liganden durch einen konstanten Fluss zu- oder abgeführt und die Änderung des Brechungsindex während der Assoziation oder Dissoziation des Liganden an das Rezeptor-Protein gegen die Zeit beobachtet werden.^[159]

Aus den erhaltenen Sensorgrammen lassen sich letztlich die kinetischen Parameter bestimmen. Da sich SPR für einen relativ hohen Durchsatz an Substanzen eignet, würde die Übertragung dieser Methode auf Rhodesain das Aufstellen einer breiten Struktur-Wirkungs-Beziehung von Cysteinprotease-Inhibitoren in Hinblick auf deren Bindungskinetiken ermöglichen.

Hierzu wurde die in Abschnitt 4.1 etablierte Methode zur chemischen Modifikation von Rhodesain angewandt, um die C3S-S279C-Mutante mit Maleimid-Biotin zu markieren. Das Rhodesain-Biotin-Konjugat wurde anschließend durch Bindung an Streptavidin-Moleküle auf der Oberfläche eines SPR-Chips immobilisiert.

In Abbildung 68 ist das Sensorgramm während der Immobilisation von Rhodesain an den SPR-Chip dargestellt. Durch die Zugabe des Konjugats kam es umgehend zu einer starken Resonanzänderung, welche durch die Bindung des Enzyms an den Streptavidin-Chip verursacht wurde (Phase II).

Beim anschließenden Equilibrieren mit Messpuffer kam es zu einem Absinken des Signals, was sich als Abdiffundieren von ungebundenem Protein interpretieren lässt (Phase III).

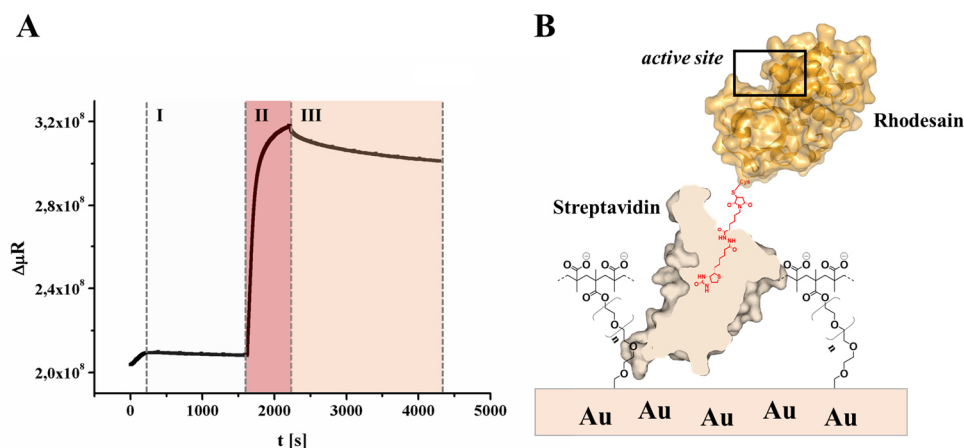
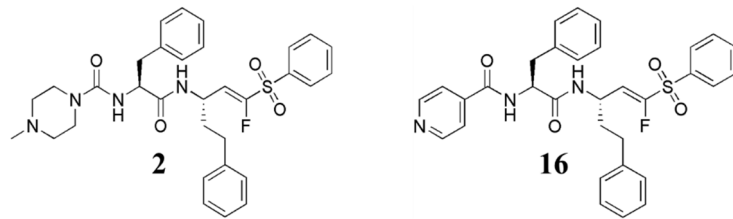


Abbildung 68: Immobilisierung von Biotin-markiertem Rhodesain-S279C auf der SPR-Chip-Oberfläche. (A) Sensorgramm der Immobilisation von biotinyliertem Rhodesain auf einem Streptavidin-modifiziertem SPR-Chip. Phase I: Equilibrierung des Chips mit Messpuffer, Phase II: Immobilisation des Rhodesain-S279C-Maleimid-Biotin-Konjugats, Phase III: Entfernen von ungebundenem Protein sowie erneute Equilibrierung mit Messpuffer. (B) Schematische Darstellung der Rhodesain-Immobilisierung. Rhodesain ist in Orange, Streptavidin in Beige und Biotin in Rot dargestellt.

Abbildung 69: Strukturformeln der Verbindungen **2** und **16**.

Der vorbereitete Chip wurde daraufhin mit den Inhibitorverbindungen **2** und **16** in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und die Änderung des Signals verfolgt (siehe Abbildung 70). Die Signalstärke des Plateaus, das sich beim Erreichen eines Equilibriums zwischen besetzten und freiem Rhodesain einstellt, stieg dabei erwartungsgemäß mit der Inhibitorkonzentration an. Allerdings wurde keine Inhibitorkonzentration beobachtet, bei welcher ein maximales Plateau-Signal (R_{\max} -Wert), d. h. vollständige Sättigung des Rhodesains durch den Inhibitor erreicht wurde.

Obwohl 100fache Konzentrationen der K_i -Werte (Inhibitoren **2** ($K_i = 190$ nM) und **16** ($K_i = 15$ nM)) eingesetzt wurden (siehe Abbildung 70, 20 μ M, Grau), kam es bei einer weiteren Erhöhung der Inhibitor-Konzentrationen (siehe Abbildung 70, 60 μ M Orange, 200 μ M Rot) zu einer zusätzlichen Steigerung des ΔR -Plateaus. Dies führte zu der Annahme, dass es sich bei den gemessenen Signalen um unspezifische Bindungen der Inhibitoren an die Oberfläche des Chips handelte. Diese Annahme wurde in Kontrollexperimenten an einem Chip ohne immobilisiertes Rhodesain bestätigt. Zudem konnte ein deutliches Signal erst ab einer Inhibitorkonzentration von 6 μ M und somit weit oberhalb der K_i -Werte der Inhibitoren beobachtet werden. Eine Erklärung dafür, dass die Bindung der Liganden an Rhodesain nicht beobachtet wurde, ist, dass Rhodesain durch die Immobilisation an die Chip-Oberfläche inaktiviert wird oder dass die Dichte an immobilisiertem Rhodesain auf dem Chip zu niedrig ist und somit die Bindung des Liganden selbst bei vollständiger Sättigung der Protease nicht erfasst werden kann.

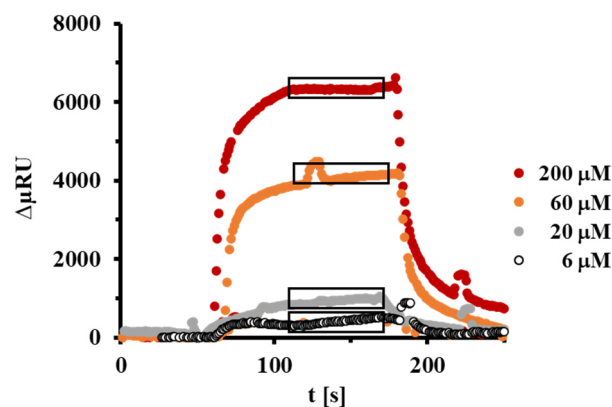


Abbildung 70: Sensorgramme der SPR-Experimente zur Bindung von Verb. **2** an Rhodesain. Biotinyliertes Rhodesain-S279C wurde auf dem SPR-Chip immobilisiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Verb. **2** inkubiert. Die Bereiche, in welchen sich ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Inhibitor herrscht, sind eingezeichnet.

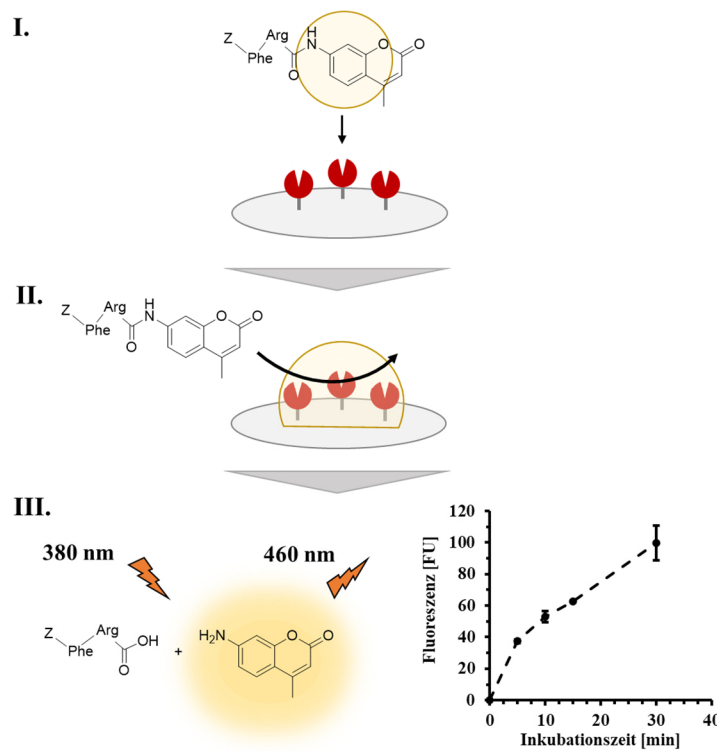


Abbildung 71: Überprüfung der katalytischen Aktivität von immobilisiertem Rhodesain auf einen SPR-Chip durch Umsetzung des Z-Phe-Arg-AMC-Substrats. (I.) Der SPR-Chip wird mit einer Assay-Puffer/Substratlösung versetzt. (II.) Während der Inkubation auf dem Chip kommt es zur Hydrolyse des Z-Phe-Arg-AMC-Substrats durch Rhodesain. (III.) Die Lösung wird nach unterschiedlichen Inkubationszeiten entnommen und die Umsetzung des Substrats durch Fluoreszenzmessungen bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm bestimmt.

Um zu überprüfen, ob Rhodesain durch den Immobilisierungsprozess inaktiviert wurde, wurde die Oberfläche des Chips mit Assaypuffer und Substrat des fluoreszenzbasierten Enzymassays (Z-Phe-Arg-AMC) inkubiert. Der Überstand wurde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten entnommen und die entstandene Fluoreszenz bestimmt. Wie in Abbildung 71 dargestellt, kam es zu einer zeitabhängigen Fluoreszenzzunahme.

Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass das Enzym durch die Bindung an den Chip nicht vollständig inaktiviert wurde. Das Resultat, dass sich trotz der erfolgreichen Immobilisierung von Rhodesain auf dem Chip keine Bindung des Inhibitors an Rhodesain detektieren ließ, könnte sich daher durch eine zu geringe Beladungsdichte mit Rhodesain erklären lassen. Dies könnte eventuell durch einen Wechsel des Chips und der Immobilisierungsstrategie korrigiert werden.

4.3 Microscale Thermophoresis

Die *microscale thermophoresis* (MST) ist eine weitere Methode, die häufig zur Affinitätsbestimmung zwischen Proteinen und Liganden angewendet wird. Bei dieser Methode wird die gerichtete Bewegung einer fluoreszierenden Probe entlang eines Temperaturgradienten verfolgt. Dieser als Thermophorese bezeichnete Prozess führt bei einer lokalen Temperaturdifferenz zur lokalen Verarmung oder Anreicherung der Probe.^[160] Die dadurch entstehenden Konzentrationsunterschiede werden durch die Fluoreszenz der Probe bestimmt. Da die Thermophorese abhängig von Ladung, Größe und Solvation der Probe ist, kann sie durch die Bindung eines Liganden an das fluoreszierende Molekül beeinflusst werden. Somit lässt sich mittels MST eine Bindungskonstante zwischen Ligand und Probe ermitteln.^[161] Für die Verwendung von Rhodesain in MST-Messungen musste das Enzym folglich mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Dabei ergaben sich ähnliche Herausforderungen, wie für die Immobilisation für SPR-Experimente (siehe 4.1 und 4.2); das Enzym musste chemisch modifiziert werden, ohne seine katalytische Aktivität zu verlieren. Daher wurde die unter 4.1 beschriebene Methode zur Markierung von Rhodesain mit Cy5- Farbstoff verwendet.

In ersten MST-Messungen mit dem Inhibitor **2** konnte eine Bindung des Liganden an Rhodesain detektiert werden (siehe Abbildung 71). Dazu wurde das MST-Signal von vollständig inhibiertem Cy5-Rhodesain ($c(\text{Inhibitor}) = 25 \mu\text{M} > 100\text{fach } K_i = 190 \text{ nM}$) mit dem des Standards (Cy5-Rhodesain ohne Inhibitor) verglichen.

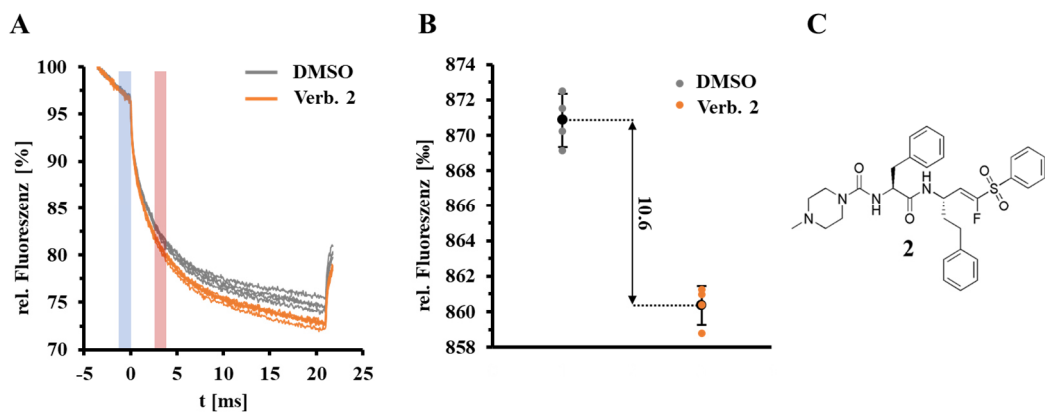


Abbildung 72: MST-Messung der Bindung von Inhibitor **2** an Cy5-markiertes Rhodesain. (A) MST-Kurven von Cy5-Rhodesain-S279C in An- (Orange) und Abwesenheit (Grau) der Verb. **2**. Aufgetragen wurde die relativen Fluoreszenzen der Proben im Verlauf der Messung. (B) Mittelwerte der DMSO (Grau) und Verb. **2** (Orange) Messpunkte sowie die Standardabweichungen und Differenzen der Mittelwerte. Die relative Fluoreszenz bezieht sich hierbei auf das Verhältnis der Fluoreszenzen nach (in A Rot unterlegt) und unmittelbar vor (in A Blau unterlegt) dem Temperatursprung. (C) Molekülstruktur der Inhibitor-Verbindung **2**.

Wie in Abbildung 72 zu erkennen ist, kam es durch eine vollständige Sättigung von Rhodesain mit Verb. **2** zu einer Änderung des MST-Signals im Vergleich zum DMSO-Standard, welche auf 10.6% bestimmt wurde. Obwohl diese relativ schwache Änderung ausreichend ist, um eine Bindung des

Liganden an Rhodopsin zu detektieren, deutet sie darauf hin, dass sich MST-Signale bei geringeren Ligandenkonzentrationen schwer unterscheiden lassen. Da für die Bestimmung eines K_D -Werts die Ligandenkonzentration sukzessive erniedrigt werden müssen, ließ sich keine Bindungskonstante zwischen Cy5-Rhodopsin und Verb. **2** mittels MST bestimmen.

4.4 Isothermale Titrationskalorimetrie

Die *isothermal titration calorimetry* (ITC) ist eine der wenigen Methoden, die es ermöglicht das thermodynamische Profil einer Bindung zwischen Reaktionspartnern in die Parameter ΔH , ΔG , ΔS und K_D aufzuschlüsseln. Sie wird daher häufig zur Charakterisierung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen genutzt.^[162]

Zudem bietet sie den Vorteil, dass sie im Unterschied zu vielen anderen Methoden keine Modifikation des Liganden oder des Proteins benötigt, wodurch das System nur minimal beeinflusst wird. Aufgrund dieser Vorteile wurde sie in dieser Arbeit verwendet, um die Bindung von Vinylsulfonen an Rhodesain hinsichtlich ihrer thermodynamischen Eigenschaften zu untersuchen. Darüber hinaus konnten mit Hilfe der *kinetic isothermal titration calorimetry-equilibration time curve* (**kinITC-ETC**)-Methode auch Aussagen über die Kinetiken der Reaktionen getroffen werden.^{[163][164]}

Neben den bereits beschriebenen Parametern wird während der ITC auch das molare Verhältnis N bestimmt, in welchem die Reaktionspartner miteinander interagieren. Für die Auswertungen der Titrations von Inhibitoren und Rhodesain wurden stets die Annahmen getroffen, dass

- 1) es nur zwischen aktivem Rhodesain und dem Inhibitor zu einer Bindung kommen kann und dass
- 2) die Inhibitoren ausschließlich durch das Thiolat im aktiven Zentrum gebunden werden.

Entsprechend der oben getroffenen Annahmen wurde das stöchiometrische Bindungsverhältnis N stets gleich 1 gesetzt und die Rhodesain-Konzentration in der Messzelle entsprechend gefittet. Als Kontrollen dienten Titrations der Inhibitoren in Puffer ohne Rhodesain. Des Weiteren wurden alle Inhibitoren als reversibel betrachtet, da zur Bestimmung der ΔG - und $-\Delta S$ -Terme der K_D -Wert benötigt wird, welcher sich aus der Steigung des Titrationskurven-Fits ergibt. Obwohl ein K_D -Wert für irreversible Liganden nicht existiert, wurde der gefittete Wert rechnerisch für weitere Analysen verwendet um die Terme ΔG und $-\Delta S$ bestimmen zu können.

Die *signature plots* der Verbindungen **1** und **2** sind in der nachfolgenden Abbildung 73 dargestellt und die entsprechenden Werte in Tabelle 15 aufgelistet. In diesen zeigt sich, dass beide Verbindungen ein ausgeprägtes ΔH -Profil aufweisen, was bedeutet, dass die Bindung der VS an Rhodesain zu einem großen Anteil enthalpisch getrieben ist. Weiterhin lässt sich erkennen, dass der entropische Beitrag im Falle des α -Fluoro-Vinylsulfons **2** im Vergleich zum Vinylsulfon **1** deutlich erhöht ist. Zuletzt weist Verb. **1** einen negativeren ΔG -Wert als Verb. **2** auf. Da eine exergonere Reaktion zu einer Erhöhung der Energiebarriere für die Rückreaktion führt und diese somit verhindern kann (siehe 1.7), steht diese Beobachtung in Übereinstimmung mit dem irreversiblen Charakter von **1**.

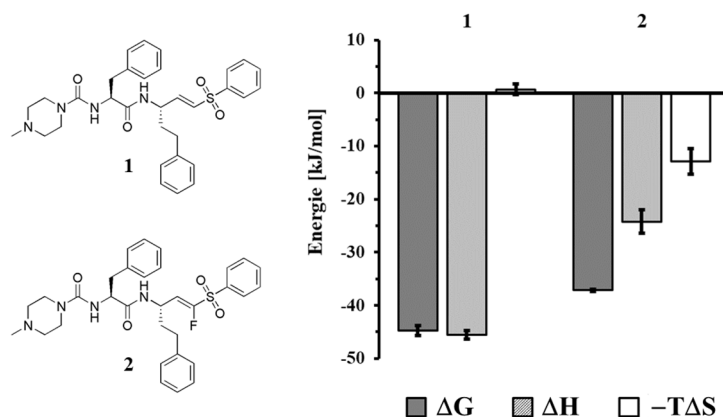


Abbildung 73: Thermodynamische Profile der Bindung der Vinylsulfon-basierten Inhibitoren **1** und **2** an Rhodesain. Dargestellt sind die Beiträge der freien Gibbs-Energie (ΔG , Dunkelgrau), Enthalpie (ΔH , Hellgrau) und des temperaturabhängigen Entropie-Terms ($-T\Delta S$, Weiß)

Tabelle 15: Auflistung der gemessenen thermodynamischen Parameter der Verbindungen **1** und **2** aus ITC-Messungen, sowie deren Gleichgewichtskonstanten K_D und der K_i -Wert aus FBE-Messungen. Mit (*) markierte Werte beziehen sich auf Gleichgewichtskonstanten irreversibler Inhibitoren. Da diese Inhibitoren kein Gleichgewicht zwischen gebundenem und nicht-gebundenem Zustand ausbilden, dürfte für sie keine Gleichgewichtskonstante existieren. Dennoch konnte auch für irreversible Inhibitoren in ITC-Messungen ein K_D -Wert bestimmt werden, welcher für die Berechnungen der ΔG - und $-T\Delta S$ -Terme verwendet wurde.

Verb.	ΔG [kJ/mol]	ΔH [kJ/mol]	$-T\Delta S$ [kJ/mol]	K_D [nM]	K_i (FBE) [nM]
1	-44.75 ± 0.96	-45.55 ± 0.99	0.64 ± 0.99	15.27 ± 5.47 *	4*
2	-37.1 ± 0.23	-24.2 ± 0.27	-12.9 ± 2.3	304.5 ± 31.3	190

Im Fall der Chloro- und Bromo-Derivate **3** und **4** konnte keine Bindung beobachtet werden, was auf die niedrigen Affinitäten der beiden Substanzen ($K_{i(3)} = 1,010$ nM; $K_{i(4)} = 860$ nM) zurückgeführt wurde.

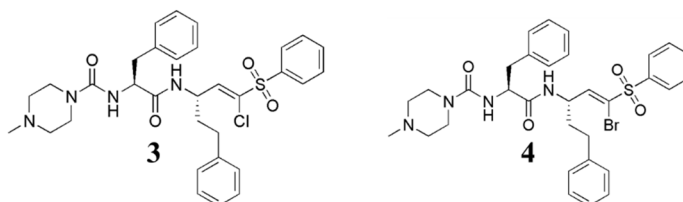


Abbildung 74: Strukturformeln der Verbindungen **3** und **4**.

Da sich jedoch auch weitere α -Fluoro-Vinylsulfone (siehe Tabelle 73) nicht messen ließen, wurde vermutet, dass während der Bindung der Inhibitoren **1** und **2** an Rhodesain eine Protonenübertragung zwischen den Methylpiperazin-Gruppen und dem Puffer stattfindet, welche letztlich für das ΔH -Signal

verantwortlich ist. Somit ließen sich die Reaktionen mit den Inhibitoren, welche keine basische Methylpiperazin-Gruppe besitzen (siehe Abbildung 75), nicht erfassen.

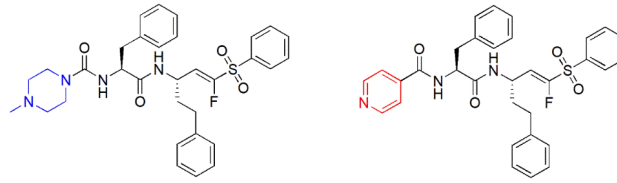


Abbildung 75: Grundgerüst der Piperazin- (Blau) und Pyridin-substituierten (Rot) Inhibitorreihe. Eine vollständige Auflistung der getesteten Substanzen befindet sich in Tabelle 73.

Um diese These zu überprüfen, wurden weitere Titrations der Verbindungen **1** und **2** in einem Piperazin-Puffer durchgeführt und mit den bisherigen Ergebnissen aus dem Acetat-Puffer verglichen. Sollte die gemessene Wärmeentwicklung auf eine Protonenübertragung zwischen Rhodesain/Inhibitor und Puffer zurückzuführen sein, müsste dieselbe Reaktion in unterschiedlichen Puffern deutlich veränderte Reaktionsenthalpien ergeben, da beispielsweise Piperazin im Unterschied zu Acetat eine stärkere Ionisierungsenthalpie aufweist.^[165]

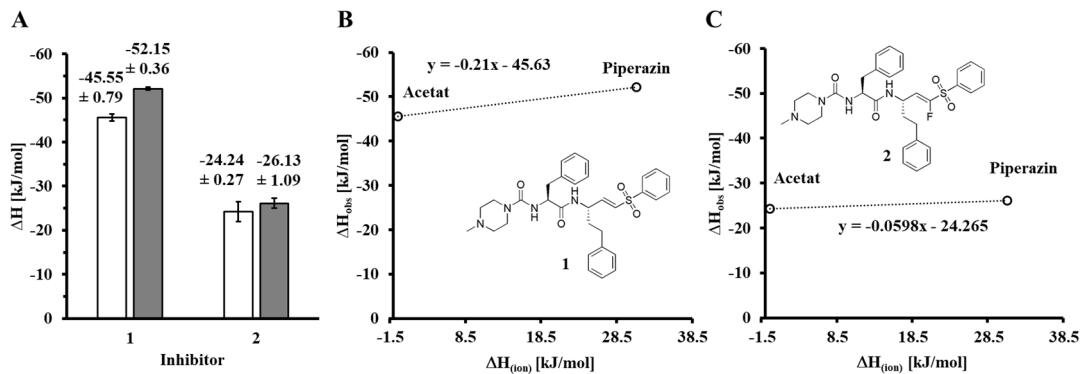


Abbildung 76: Untersuchung der Bindung von (α -Fluoro-)Vinylsulfonen an Rhodesain auf Protonentransfer mittels ITC. (A) Molare Bindungs-Enthalpien ΔH der Bindung von Rhodesain an Verb. **1** und **2** in ITC-Messungen in Acetat- (Weiß) und Piperazin-Puffern (Grau). (B + C) Auftragung der molaren Bindungsenthalpien $\Delta H_{(\text{obs})}$ von Rhodesain mit Verb. **1** und **2** gegen die Standardionisierungsenthalpien $\Delta H_{(\text{ion})}$ der jeweiligen Puffer. Aus den Steigungen der Regressionsgeraden lässt sich die Zahl der Protonen berechnen, welche pro Bindungsereignis transferiert werden.

Wie aus Abbildung 76 hervorgeht, wichen die molaren Enthalpien beider Verbindungen in den unterschiedlichen Puffern nur geringfügig voneinander ab. Lediglich in der Titration von Verbindung **1** ließ sich eine Differenz von 7 kJ/mol beobachten. Dieser Unterschied ist im Vergleich zur berechneten Differenz von 31.52 kJ/mol, welche bei einer einfachen Protonenübertragung zu erwarten gewesen wäre, jedoch gering.

$$\Delta H_{(ion, Piperazin)}^{\circ} - \Delta H_{(ion, Acetat)}^{\circ} = (31.11 - (-0.41)) \text{ kJ/mol} = 31.52 \text{ kJ/mol} \quad (4)$$

Durch Auftragen gemessener ΔH -Signale gegen die Ionisierungsenthalpien lässt sich zudem die Anzahl der Protonen bestimmen, welche pro Bindungsereignis übertragen werden (siehe Abbildung 76).

Aus den Regressionsgeraden ergibt sich, dass im Fall von Verbindung **1** 0.21 und im Fall von Verbindung **2** 0.06 Protonen pro Bindung übertragen werden. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die gemessenen Signale auf einen Protonentransfer zurückzuführen sind (siehe Abbildung 76).

Wie zuvor erwähnt, unterschieden sich die weiteren α -Fluor-VS, welche trotz ihrer hohen Affinität nicht messbar waren, von den Verbindungen **1** und **2** bezüglich der basischen Methylpiperazin-Gruppe. Da beobachtet wurde, dass sich der Verlust des basischen Piperazin-Rings negativ auf das Lösungsverhalten der Inhibitoren auswirkte, wurde die Löslichkeit der Verbindungen als weiterer limitierender Faktor in Erwägung gezogen. Zur Überprüfung dieser These wurden im Verlauf der Masterarbeit von [REDACTED] die Verbindungen **5** und **6** synthetisiert.

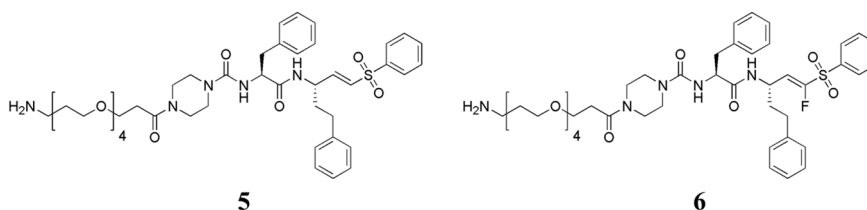


Abbildung 77: Strukturformeln der Inhibitoren **5** und **6**.

Beide Verbindungen unterschieden sich hinsichtlich der bereits getesteten Verbindungen **1** und **2** durch einen PEG-Linker, der über ein Amid an das Piperazin-Gerüst der Inhibitoren gekoppelt wurde. Durch diesen Linker konnte somit der basische Charakter des Piperazin-Gerüsts ohne gleichzeitigen Verlust der Wasserlöslichkeit eliminiert werden. Trotz des Verlusts der basischen Methylpiperazin-Gruppe konnte in den ITC-Messungen eine Bindung der Inhibitoren **5** und **6** an Rhodesain detektiert werden (siehe Abbildung 78 und Tabelle 16). Daher wurde geschlossen, dass die Löslichkeit der Inhibitoren ausschlaggebend für deren Messbarkeit ist.

Beim Vergleich der beiden PEGylierten Inhibitoren **5** und **6** untereinander zeigen sich ähnliche Verhältnisse, wie beim Vergleich zwischen den Verbindungen **1** und **2**. So wurde für beide Inhibitorpaare beobachtet, dass die Bindung der Vinylsulfone an Rhodesain exothermer verläuft als bei ihren α -Fluoro-VS-Gegenständen. Zudem besitzen die α -Fluoro-VS negativere Entropie-Terme als die Vinylsulfone.

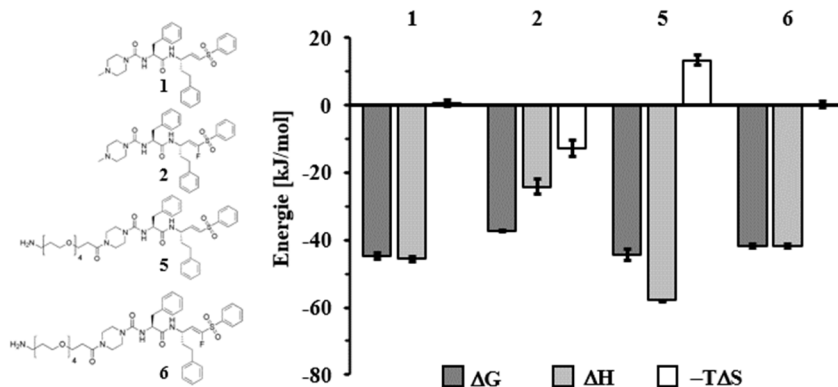


Abbildung 78: Thermodynamisches Profil der Bindung der Vinylsulfon-basierten Inhibitoren **1** und **2** sowie ihrer PEGylierten Analoga **5** und **6** an Rhodesain aus ITC-Messungen. Dargestellt sind die Beiträge der freien Gibbs-Energie (ΔG , Dunkelgrau), der Enthalpie (ΔH , Hellgrau) und des temperaturabhängigen Entropie-Terms ($-T\Delta S$, Weiß).

Tabelle 16: Auflistung der gemessenen thermodynamischen Parameter der Verbindungen **1** und **2** aus ITC-Messungen, sowie deren Gleichgewichtskonstanten K_D und der K_i -Wert aus FBE-Messungen. Mit (*) markierte Werte beziehen sich auf Gleichgewichtskonstanten irreversibler Inhibitoren. Da diese Inhibitoren kein Gleichgewicht zwischen gebundenem und nicht-gebundenem Zustand ausbilden, dürfte für sie keine Gleichgewichtskonstante existieren. Dennoch konnte auch für irreversible Inhibitoren in ITC-Messungen ein K_D -Wert bestimmt werden, welcher für die Berechnung der ΔG - und $-T\Delta S$ -Terme verwendet wurde.

Verb.	ΔG [kJ/mol]	ΔH [kJ/mol]	$-T\Delta S$ [kJ/mol]	K_D [nM]	$K_{i(\text{FBE})}$ [nM]
1	-44.75 ± 0.96	-45.55 ± 0.99	0.64 ± 0.99	$15.27 \pm 5.47^*$	4^*
2	-37.1 ± 0.23	-24.2 ± 0.27	-12.9 ± 2.3	304.5 ± 31.3	190
5	-44.45 ± 1.65	-57.89 ± 0.12	13.39 ± 1.48	$19.65 \pm 11.48^*$	$1.2 \pm 0.1^*$
6	-44.03 ± 0.85	-41.1 ± 0.432	-2.96 ± 0.96	20.3 ± 7.6	7.4 ± 1.9

Vergleicht man die PEGylierten Inhibitoren mit ihren Methylpiperazin-Gegenstücken, so lassen sich auch hier Parallelen ziehen. In beiden Fällen führte das Anfügen eines PEG- Linkers zu einer Positivierung des $-T\Delta S$ -Terms, wobei die Differenz für beide Paare ähnlich hoch war.

$$(-T\Delta S_5) - (-T\Delta S_1) = (13.39 - 0.64) \text{ kJ/mol} = 12.75 \text{ kJ/mol}$$

$$(-T\Delta S_6) - (-T\Delta S_2) = (-2.96 + 12.9) \text{ kJ/mol} = 9.94 \text{ kJ/mol}$$

Diese Übereinstimmung deutet darauf hin, dass das Anfügen des PEG-Linkers zu einer Entropiestrafe von ~ 10 - 12 kJ/mol führt. Dies lässt sich durch die hohe Flexibilität der PEG-Kette erklären, welche während der Bindung an das Enzym zu einem zusätzlichen Verlust an Freiheitsgraden führt.

Zudem wies Verbindung **6** im Vergleich zu **2** einen sechsfach niedrigeren K_D -Wert auf. Diese Beobachtung deckt sich mit der *structure activity relationship* (**SAR**) anderer α -Fluoro-VS aus fluoreszenzbasierten Enzymassays, in denen der Austausch des Methylpiperazin-Rings gegen nicht protonierbare Gruppen zu einer höheren Affinität führte.^[104]

4.5 kinITC-ETC

Um die kinetischen Konstanten der α -Fluoro-VS-Rhodesain-Bindung zu erhalten, wurden die Daten der ITC-Experimente (siehe 4.4) mit Hilfe der *kinITC*-Software von *AFFINImeter* (Santiago de Compostela, Spanien) ausgewertet. Dazu wurde das stöchiometrische Bindungsverhältnis zwischen Ligand und Enzym $N = 1$ gesetzt und die Konzentration an aktivem Rhodesain in der Messzelle gefittet. Anschließend wurden die Equilibrierungszeiten (*equilibration times*) als Abstand zwischen dem Beginn jeder Injektion und dem Punkt festgesetzt, an welchem das Signal zur Basislinie zurückkehrte. Aus den erhaltenen Equilibrierungszeiten wurde anschließend durch die *AFFINImeter*-software eine *equilibration time curve* (ETC)-Kurve gefittet (siehe Abbildung 79).

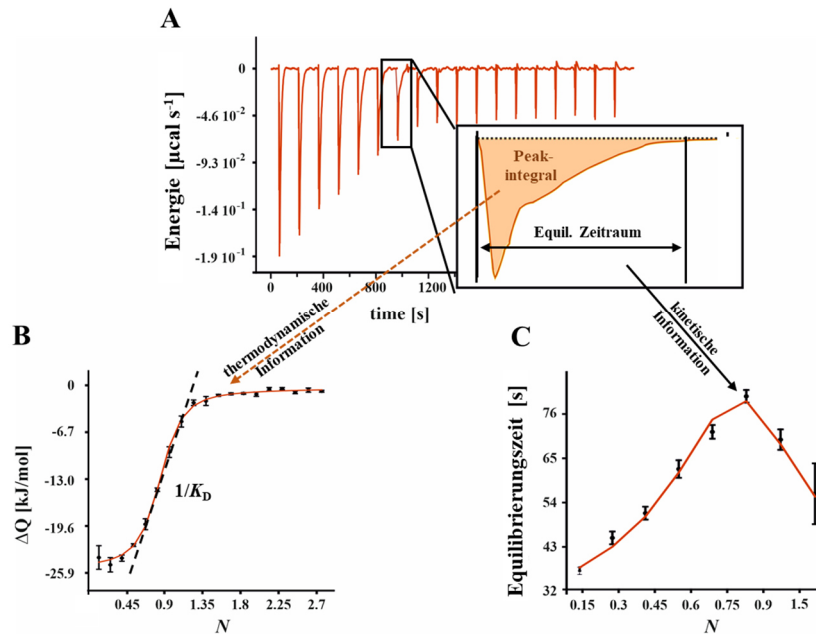


Abbildung 79: Schematische Darstellung der klassischen ITC-Auswertung und der kinITC ETC-Methode. (A) ITC-Thermogramm der Bindung von Rhodesain an Verb. 2. Das Integral der zugeführten Wärmeenergie eines einzelnen Titrationsschritts ist vergrößert in Orange dargestellt. Beispielhaft wurde der Equilibrierungszeitraum durch schwarze Balken markiert. (B) Auftragung der Integrale einzelner Titrationsschritte gegen das jeweilige molare Verhältnis N von Ligand (Verbindung 2) zu Rezeptor (Rhodesain) in der Messzelle. K_D wird aus der Steigung der Kurve und ΔH direkt aus dem Wärmesignal erhalten. (C) Auftragung der Equilibrierungszeiträume gegen das molare Verhältnis N . Die kinetische Konstante der Dissoziation k_{off} wird aus dem Fit der Kurve (*AFFINImeter*-Software) erhalten.

Aus den ETC-Kurven wurde wiederum der k_{off} -Wert der Bindung des Inhibitors an Rhodesain erhalten. Da die K_D -Werte bereits aus konventionellen ITC-Messungen bekannt waren, ließ sich aus den Daten der k_{on} -Wert nach der Formel (4) berechnen (siehe Tabelle 17).

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (5)$$

Tabelle 17: Aus der *kinITC-ETC* erhaltene Werte der Inhibitoren 2 und 6.

Verbindung	K_D [nM]	k_{on} [$10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$]	k_{off} [10^{-4} s^{-1}]
2	304.5 ± 31.3	4.20 ± 1.64	128.03 ± 48.29
6	20.3 ± 7.6	17.18 ± 6.52	34.9 ± 1.79

Eine Erhöhung der Affinität eines Inhibitors oder Liganden kann sowohl aus einer beschleunigten Assoziation (Erhöhung von k_{on}) als auch aus einer verlangsamten Dissoziation (Verringerung von k_{off}) vom *target* resultieren.

Aus den oben gezeigten Daten wird ersichtlich, dass die höhere Affinität der Verb. 6 (niedrigere K_D -Wert) im Vergleich zu Verb. 2 sowohl aus einer Erhöhung des k_{on} - als auch aus einer Verringerung des k_{off} -Werts hervorgeht. Somit besitzt Verb. 6 eine längere Verweildauer am Enzym.

Als Vergleich für die erhaltenen kinetischen Informationen aus den *kinITC-ETC*-Experimenten wurden Daten aus der Dissertation von [REDACTED] herangezogen, in welcher die kinetischen Konstanten der Rhodesain- α -Fluoro-VS-Bindung an Verb. 7 bestimmt wurden (siehe Abbildung 80).^[104] Dies geschah mittels *inverse surface plasmon resonance (iSPR)*, bei welcher der Inhibitor über einen Thioalkyl-Linker auf einem SPR-Chip immobilisiert und die Bindung von Rhodesain an den Inhibitor detektiert wurde.

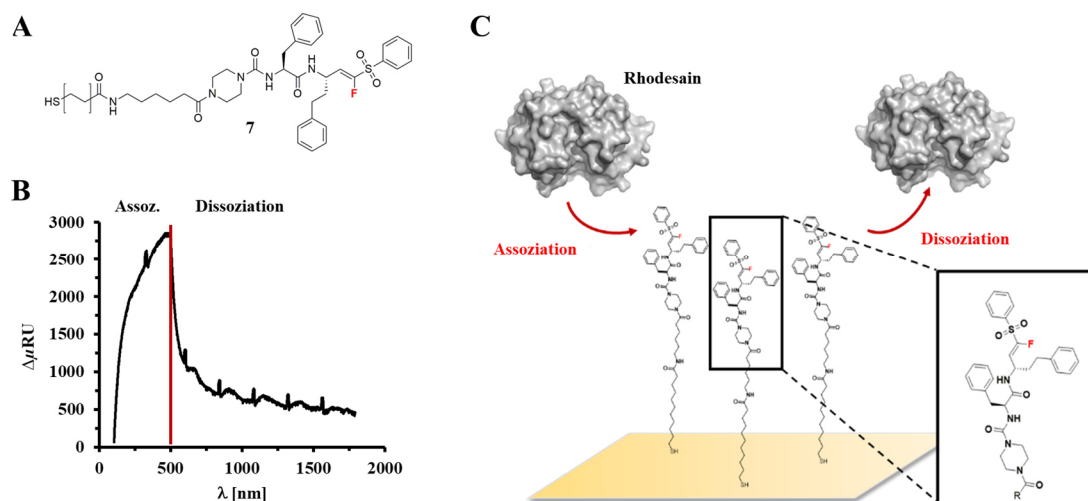


Abbildung 80: Prinzip der inversen SPR-Messung. Der reversible Inhibitor 7 (A) ist mittels Thioalkyl-Linker auf der Goldoberfläche eines SPR-Chips immobilisiert. Aus dem Sensorgramm (B), welches während der Assoziation und Dissoziation von Rhodesain (C) aufgenommen wird, werden die kinetischen Konstanten der Rhodesain-Inhibitor-Bindung bestimmt.

Aus dem erhaltenen Sensorgramm konnten die k_{on} - und k_{off} -Konstanten ermittelt werden, welche ergänzend in Tabelle 18 angegeben sind.

Tabelle 18: Vergleich von K_D -, k_{on} und k_{off} -Werten verschiedener α -Fluoro-Vinylsulfone, welche mittels kinITC-ETC oder iSPR bestimmt wurden.

Experiment	K_D [nM]	k_{on} [$10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$]	k_{off} [10^{-4} s^{-1}]
kinITC-ETC, 2	304.5 ± 31.3	4.20 ± 1.64	128.03 ± 48.29
kinITC-ETC, 6	20.3 ± 7.6	17.18 ± 6.52	34.9 ± 1.79
iSPR, 7	51 ± 12	9.58 ± 2.57	49.0 ± 12.0

Beim Vergleich der erhaltenen kinetischen Konstanten fällt auf, dass die Verbindungen **6** und **7** ähnliche k_{on} - und k_{off} -Werte besitzen. Größere Unterschiede ergeben sich beim Vergleich der Verbindungen **2** und **7**, deren k_{off} -Werte deutlich voneinander abweichen. Diese Beobachtung könnte sich durch die größere Strukturähnlichkeit zwischen **6** und **7** erklären lassen, da beide Inhibitoren durch Konjugation eines Linkers keine basische Methylpiperazin-Gruppe besitzen.

4.6 Rhodopsin-Q127W-Mutante ermöglicht PET-FCS-Experimente und Einblicke in die Bindungskinetik von VS-basierten Inhibitoren

Für weitere Einblicke in die Bindungskinetiken und Dynamiken zwischen kovalent (ir)reversiblen Inhibitoren und Rhodopsin, wurden in Zusammenarbeit mit [REDACTED] PET-FCS-Studien durchgeführt. Das Prinzip dieser Messung beruht auf einem *photoinduced electron transfer* (PET), der zwischen einem Tryptophan und einem Atto-Farbstoff auftreten kann, wenn sich diese in räumlicher Nähe und passender Geometrie zueinander befinden (siehe 8.1).^{[166][167]} Da dieser Effekt zu einer Löschung der Farbstofffluoreszenz führt, kann jedes Kontaktereignis zwischen Trp und Atto-Farbstoff durch die Kombination mit *fluorescence correlation spectroscopy* (FCS)-Messungen einem zeitlichen Rahmen zugeordnet werden. Die Kombination aus PET- und FCS-Messungen ermöglicht es somit Dynamiken innerhalb des Enzym-Inhibitor-Komplexes aufzuklären. Darüber hinaus kann die Bindung des Inhibitors an das Enzym durch die Abnahme der Fluoreszenz detektiert werden, wodurch sich Assoziations- und Dissoziationskonstanten bestimmen lassen (siehe 8.1).

Somit wurden für diese Versuche Vinylsulfon-basierte Inhibitoren mit Atto655-Farbstoffen modifiziert und anschließend mit einem Überschuss der Protease inkubiert. Die dafür verwendeten Inhibitoren wurden von [REDACTED] zur Verfügung gestellt, die Markierung der Inhibitoren, sowie die Messungen wurden von [REDACTED] durchgeführt. Die notwendigen Modifikationen des Enzyms sind dabei Teil dieser Arbeit.

Eine notwendige Voraussetzung für die Messungen ist, dass durch die Bindung der Inhibitoren an Rhodopsin ein Kontakt zwischen dem Atto-Farbstoff und einem Tryptophan erzeugt wird. Jedoch zeigten erste Vorversuche, dass eine Fluoreszenzlöschung durch die Bindung der Inhibitoren an WT-Rhodopsin ausbleibt, weshalb dieses nicht für die PET-FCS-Messungen genutzt werden kann. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass, obwohl WT-Rhodopsin sieben Tryptophane besitzt, offensichtlich keines in Kontakt mit dem Farbstoff kommt (siehe Abbildung 81 A). Daher wurden Rhodopsin-Konstrukte generiert, welche durch eine Q127W-, F167W- oder Q265W-Mutation (Q21W-, F61W- und Q159W-Mutationen bezogen auf die Nummerierung von *mature* Rhodopsin) ein zusätzliches Tryptophan an unterschiedlichen Stellen des Enzyms besitzen (siehe Abbildung 81 B). Diese Mutanten wurden ausgewählt, da erwartet wurde, dass die Seitenketten der artifiziellen Tryptophane lösungsmittel exponiert entlang des *active site cleft* vorliegen und so in Kontakt mit den Atto-Farbstoff kommen können.

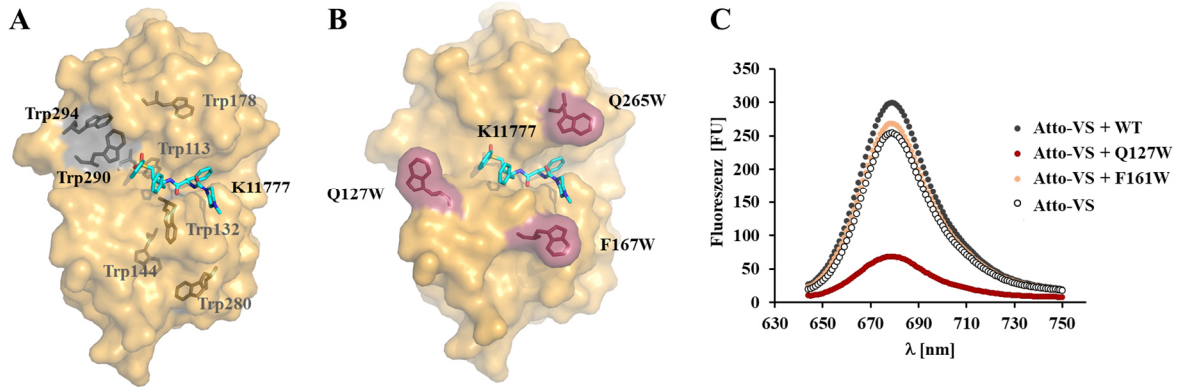


Abbildung 81: Validierung unterschiedlicher Rhodesain-Mutanten für PET-FCS-Messungen. (A) Darstellung der natürlich vorkommenden Tryptophane (Grau) in Rhodesain (Orange). Die Nummerierung bezieht sich auf die Pro-Rhodesain-Kristallstruktur. (B) Darstellung der verwendeten PET-FCS-Mutanten anhand der Kristallstruktur 2P7U. Die künstlichen Tryptophane sind rot hervorgehoben, wobei jeweils nur ein einzelnes Tryptophan pro Mutante eingeführt wurde. Zusätzlich ist die Lage des Liganden K11777 (Cyan) in der Bindetasche des Enzyms (Orange) dargestellt. (C) Fluoreszenzspektren des Atto-markierten VS vor und nach der Zugabe unterschiedlicher Rhodesain-Mutanten.

Wie aus Abbildung 81 B zu entnehmen ist, erzielte die Einführung der Q127W-Mutation die stärkste Fluoreszenzlöschung. Zudem wurden die Faltung und Substratspezifität des Rhodesains durch diese Mutation nicht beeinflusst, was aus den übereinstimmenden CD-Spektren und den enzymkinetischen Konstanten des WTs und der Mutante geschlossen wurde (siehe Abbildung 82). Daher wurde die Rhodesain-Q127W-Mutante für weitere Versuche verwendet.

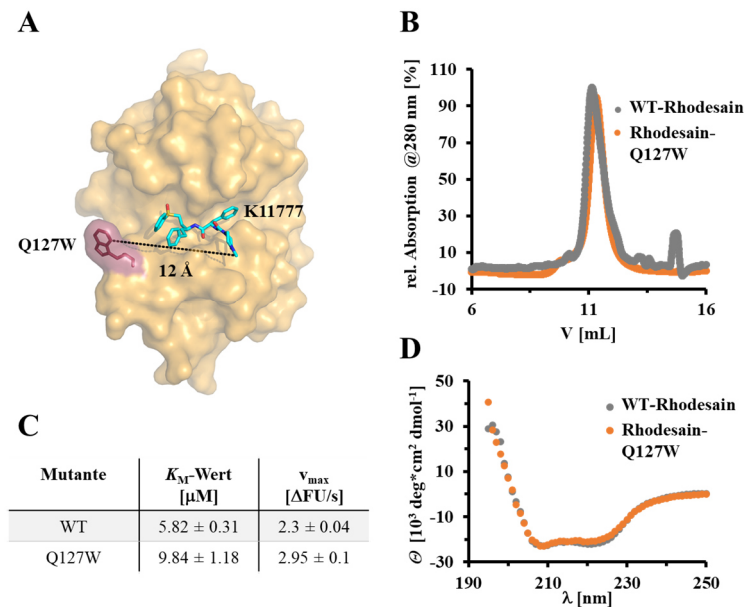


Abbildung 82: Vergleich der Rhodesain-Q127W-Mutante mit WT-Rhodesain. (A) Darstellung des K11777-Rhodesain-Q127W-Komplexes basierend auf der Kristallstruktur 2P7U. Die Methylpiperazin-Gruppe, an welcher der Farbstoff im Experiment angebracht wurde, befindet sich in großer Distanz zum eingeführten Trp127-Rests. (B) Überlagerung der CD-Spektren von WT-Rhodesain und der Q127W-Mutante. (C) Auflistung der enzymkinetischen Parameter von WT-Rhodesain und der Rhodesain-Q127W-Mutante. (D) Überlagerung der CD-Spektren von WT-Rhodesain und der Q127W-Mutante.

Allerdings erschien ein Kontakt zwischen dem artifiziellen Trp127 und dem Atto-Farbstoff zunächst nicht plausibel, da angenommen wurde, dass die Vinylsulfone eine ähnliche oder gleiche Orientierung in der aktiven Tasche des Rhodesains einnehmen wie der verwandte Inhibitor K11777 in der Kristallstruktur 2P7U. Unter dieser Voraussetzung würden sich Tryptophan und Farbstoff auf gegenüberliegenden Seiten des aktiven Zentrums befinden.

Eine Möglichkeit, mit der sich eine WW zwischen dem Atto-Farbstoff und dem Trp127 erklären ließe, ist, dass sich der Linker über den gesamten *active site cleft* legt. Ein solches Verhalten wäre denkbar, da es sich beim Linker um eine hydrophobe Alkankette handelt und somit ein hydrophobes „Kollabieren“ über den *active site cleft* zur Oberflächenverkleinerung führen würde.

Nach den Vorversuchen wurden PET-FCS-Spektren von Farbstoff-markierten irreversiblen und reversiblen Inhibitoren in An- und Abwesenheit von Rhodesain-Q127W aufgenommen (siehe Abbildung 83).

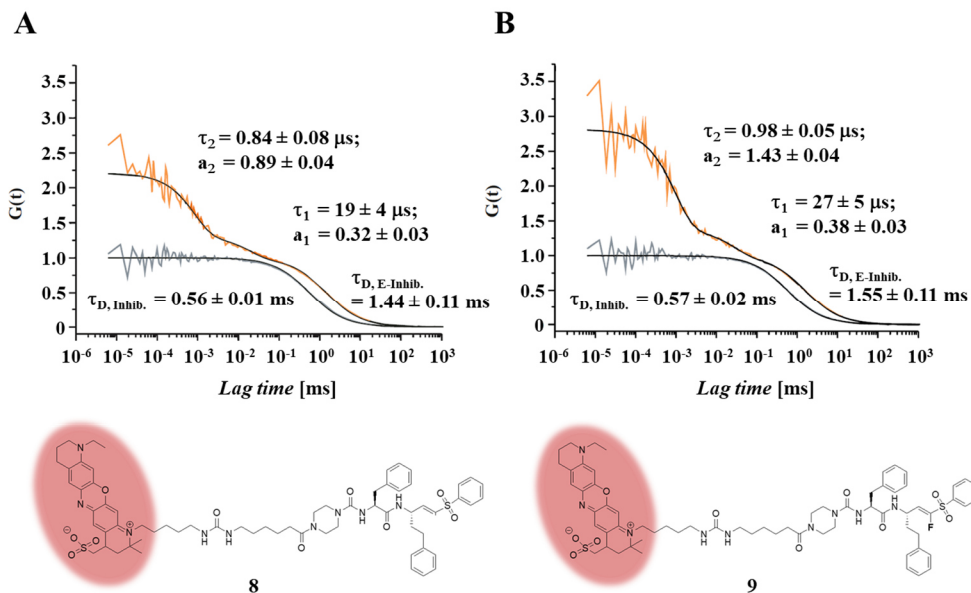


Abbildung 83: PET-FCS-Spektren des Atto-markierten, irreversiblen Inhibitors (A, 8) und des reversiblen Inhibitors (B, 9) in Ab- (Grau) und in Anwesenheit von Rhodesain-Q127W (Orange). Die Strukturformeln der zugehörigen Inhibitoren sind unter den jeweiligen Spektren angegeben.

Wie in den Spektren beider Inhibitoren zu erkennen ist, konnte durch die Zugabe des Enzyms ein deutlicher *shift* in der Diffusionszeitkonstanten des Atto655-Vinylsulfons von $\tau_D = 0.57 \pm 0.02 \text{ ms}$ auf $\tau_D = 1.55 \pm 0.11 \text{ ms}$ bzw. $0.56 \pm 0.01 \text{ ms}$ auf $\tau_D = 1.44 \pm 0.11 \text{ ms}$ beobachtet werden. Dies lässt sich durch die Bindung des Inhibitors an das Enzym erklären, durch welche das Molekulargewicht und der hydrodynamische Radius der Inhibitor-Farbstoff-Konjugate erheblich erhöht und damit die Diffusionsgeschwindigkeiten deutlich verlangsamt wurden. Zudem traten weitere PET-Ereignisse im mittleren und unteren Mikrosekundenmaßstab auf, welche in der nachfolgenden Tabelle 19 aufgelistet sind.

Tabelle 19: Erhaltene Zeitkonstanten τ und Amplituden A der PET-Ereignisse während der PET-FCS-Messungen von reversiblen und irreversiblen Inhibitoren und Rhodessain-Q127W.

	Ereignis 1		Ereignis 2	
	Zeitkonst. τ [μ s]	Amplitude A	Zeitkonst. τ [μ s]	Amplitude A
reversibel	19 ± 4	0.32 ± 0.03	0.84 ± 0.08	0.89 ± 0.04
irreversibel	27 ± 5	0.38 ± 0.03	0.98 ± 0.05	1.43 ± 0.04

Aus Tabelle 19 ist zu entnehmen, dass keine gravierenden Unterschiede zwischen einem irreversiblen und einem reversiblen Inhibitor für das Ereignis 1 im mittleren Mikrosekundenbereich bestehen, da die Zeitkonstanten und die Amplituden dieses Ereignisses vergleichbare Werte aufweisen. Deutliche Unterschiede wurden jedoch im unteren Mikrosekundenbereich (Ereignis 2, τ_2) beobachtet, in welchem der irreversible Inhibitor sowohl eine höhere Amplitude als auch eine höhere Zeitkonstante als der reversible Inhibitor aufweist. Diese Ergebnisse deuten somit auf eine unterschiedliche Dynamik von irreversiblen und reversiblen Inhibitoren innerhalb der Bindetasche des Enzyms hin.

4.6.1 MD-Simulationen zur Untersuchung des Atto-VS/Rhodessain-Q127W-Systems

Obwohl in den PET-FCS-Messungen ein Unterschied zwischen kovalent-reversiblen und irreversiblen Inhibitoren beobachtet wurde, lassen sich diese Ergebnisse auf molekularer Ebene nur schwer interpretieren. Daher wurden MD-Simulationen von Rhodessain-Inhibitor-Komplexen von [REDACTED] durchgeführt. Diese sollten eine Interpretation der PET-FCS-Resultate ermöglichen und somit Einblicke in die Dynamiken der Inhibitoren innerhalb der Rhodessain-Bindetasche geben. Im Zuge dieser Simulationen sollte weiterhin die Frage geklärt werden, ob eine Orientierung des Farbstoff-Linkers über den *active site cleft* hin zu Trp127 wahrscheinlich ist.

Grundlage der Simulationen war die Kristallstruktur 2P7U, in welche die Q127W-Mutation eingefügt und der Farbstoff an den K11777-Liganden modelliert wurde. Die Simulationen wurden sowohl für den reversiblen als auch für den irreversiblen Inhibitor durchgeführt.

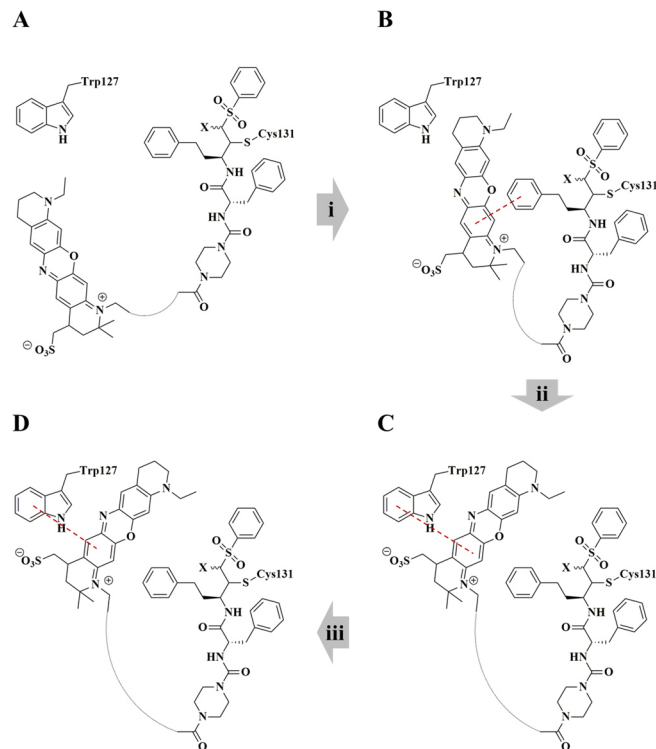


Abbildung 84: MD-Simulationen zur Untersuchung des Atto-VS/Rhodesain-Q127W-Systems. (A) Startstruktur der ersten konventionellen MD-Simulation ist die Kristallstruktur 2P7U. Der Atto-Farbstoff ist über einen Linker an die Methylpiperazin-Gruppe des K11777 modelliert. (B) Während der ersten konventionellen MD (i) orientiert sich der Farbstoff entlang des active site clefts des Rhodesains wobei ein π -stacking-System zwischen dem Atto-Farbstoff und der hPhe-Seitenkette des K11777 ausgebildet wird. (C) Durch die accelerated MD (ii) wird das lokale Energieminimum der hPhe-Atto-WW überwunden, wodurch eine Interaktion zwischen Trp127 und Farbstoff ausgebildet wird. (D) Dieses π -stacking-System bleibt auch in einer anschließenden konventionellen MD (iii) erhalten.

Während dieser konventionellen 100 ns langen MDs kam es zu einer Orientierung des Farbstoffs in Richtung des Trp127. Allerdings wurde ausschließlich ein *stacking* zwischen dem aromatischen System des Farbstoffs und der hPhe-Seitenkette des Liganden beobachtet (siehe Abbildung 84 A–B). Daher wurden im Anschluss daran 1000 ns *accelerated molecular dynamic simulations* (aMDs) durchgeführt. Diese unterscheiden sich von konventionellen MDs darin, dass dem System beim Erreichen eines lokalen Energieminimums Energie zugeführt wird, um konformelle Änderungen zu beschleunigen. In diesen aMDs konnte letztlich ein co-planares *stacking* zwischen Trp127 und dem Farbstoff beobachtet werden (siehe Abbildung 84 A – C).

Um zu überprüfen, ob diese WW auch in konventionellen MDs erhalten bleibt, wurden die *frames* eines 200 ns Zeitfensters (Bereich in dem ein *stacking* zwischen Trp127 und Farbstoff in dem aMDs zu beobachten war) gemittelt und der *frame*, welcher zum Mittel den geringsten RMSD aufwies, als Startstruktur gewählt.

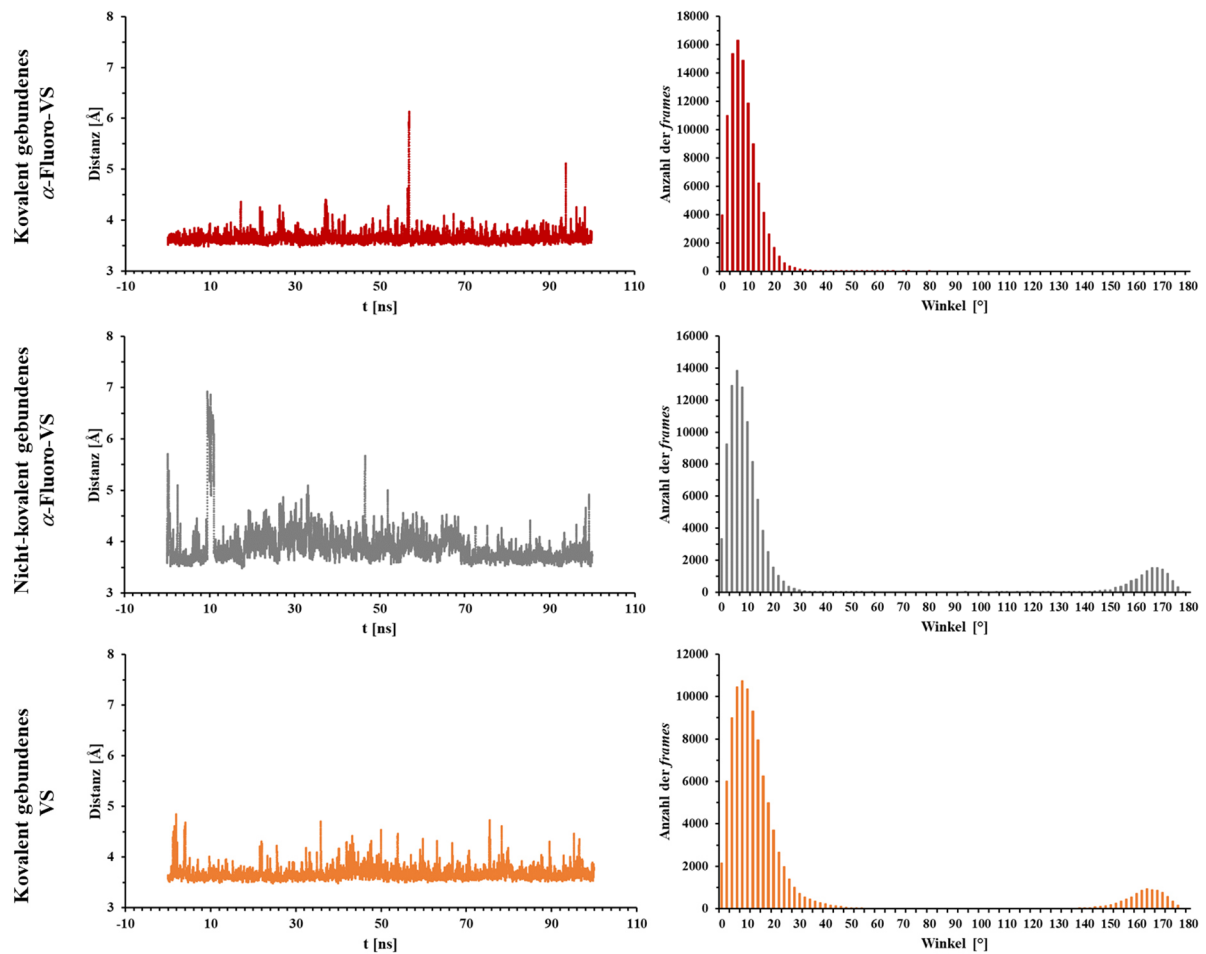


Abbildung 85: Auswertung der zweiten, konventionellen MD-Simulationen von kovalent gebundenem Atto-VS, sowie kovalent und nicht-kovalent gebundenem Atto- α -Fluoro-Vinylsulfon. Dargestellt ist jeweils der Abstand zwischen Trp127 und dem zweiten Ring des Atto-Farbstoffs (moving average über 50 frames), sowie die Anzahl der frames in denen ein bestimmter Winkel zwischen den beiden Ringsystemen beobachtet wurde.

Die anschließenden konventionellen MD-Simulationen wurden sowohl für kovalent als auch für nicht kovalent gebundene Inhibitoren über 100 ns durchgeführt. In diesen Simulationen blieben die Winkel und Distanzen der co-planaren WW zwischen Farbstoff und Try127 weitestgehend erhalten (siehe Abbildung 85).

Aus diesen MD-Simulationen ließ sich schließen, dass ein *stacking* zwischen Trp127 und dem Farbstoff theoretisch möglich ist und dass dieser Zustand ein lokales Energieminimum darstellt, was die Beobachtungen der PET-FCS-Ergebnisse bekräftigt. Dabei begünstigt eine initiale Interaktion zwischen der hPhe-Seitenkette des gebundenen Inhibitors zunächst die Orientierung des Atto-Farbstoffs entlang des *active site clefts*, bevor es zu einem *stacking* zwischen Trp127 und dem Atto-Farbstoff kommt. Da dem System während der Berechnung der aMDs künstlich Energie zugeführt und damit eine Änderung des Systems vorgenommen wurde, konnten diese Simulationen jedoch nicht für eine detaillierte Interpretation der PET-FCS-Ereignisse verwendet werden.

4.6.2 Bestimmung der Bindungskinetiken von VS an Rhodesain durch *rapid-mixing* -Experimente

Neben den Untersuchungen der Dynamiken der Inhibitoren in der Bindetasche des Rhodesains wurde das Atto-VS/Rhodesain-Q127W-System ebenfalls für die Charakterisierung der Bindungskinetik genutzt. Dazu wurden Mischungsexperimente von [REDACTED] durchgeführt, in welchen die Assoziation und Dissoziation des reversiblen Inhibitors (Abbildung 83) an Rhodesain verfolgt wurden. Für die Bestimmung der Assoziationskinetik wurde der Ligand in Rhodesain-Q127W-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen injiziert und die Abnahme der Fluoreszenz gegen die Zeit verfolgt. Die Ratenkonstanten k_{obs} der Fluoreszenzabnahme wurde gegen die jeweilige Rhodesain-Konzentration aufgetragen und die Assoziationskonstante über einen linearen Fit bestimmt. Die Messung der Dissoziation wurde in einem *chasing-off*-Experiment durchgeführt, in welchem der Farbstoff-markierte Inhibitor durch den irreversiblen Liganden K11777 verdrängt wurde. Folglich wurde in diesen Experimenten eine zeitabhängige Fluoreszenzzunahme beobachtet. Der Farbstoff-markierte irreversible Inhibitor **8** konnte nicht durch K11777 verdrängt werden.

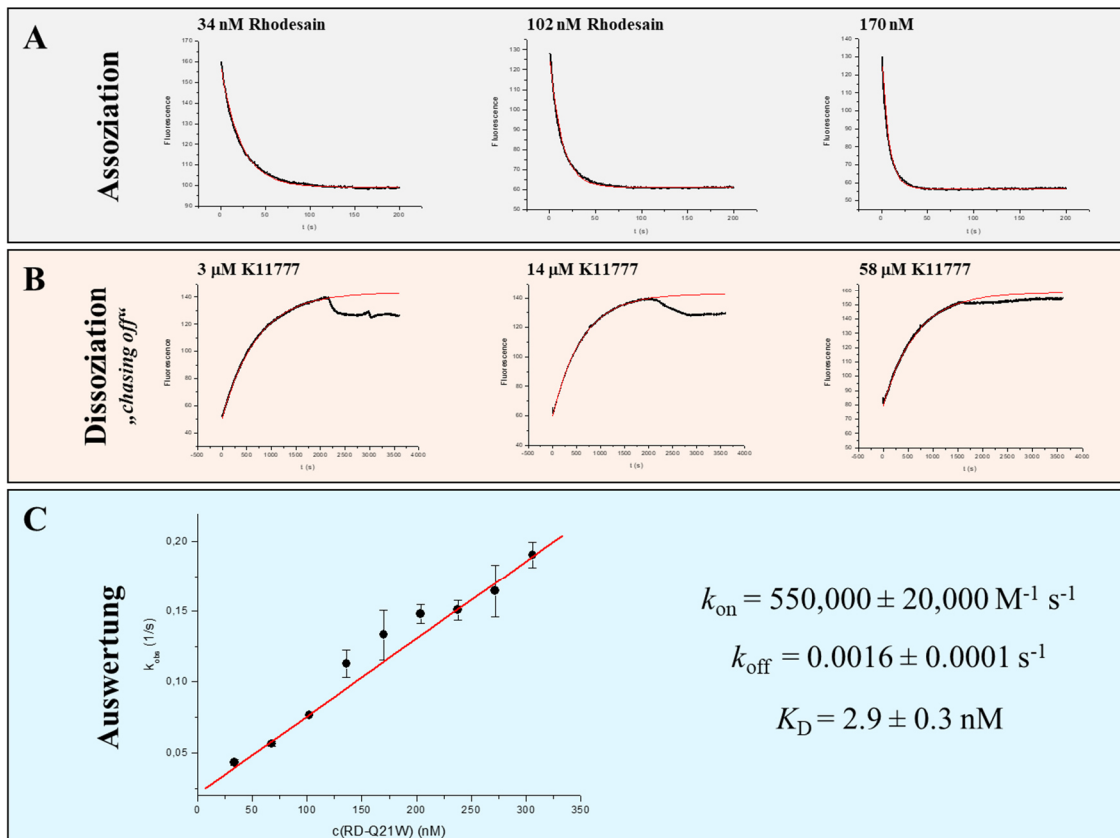


Abbildung 86: Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationskonstanten unter Verwendung des Atto-VS/Rhodesain-Q127W-Systems. (A) Auftragungen der Fluoreszenz gegen die Zeit, sowie deren Fits nach Zugabe des Atto-Farbstoff-markierten α -Fluoro-VS in Rhodesain-Q127W-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen. (B) Auftragung Fluoreszenz gegen die Zeit, sowie deren Fits nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an irreversiblen Inhibitor K11777 in eine Lösung aus Rhodesain-Q127W-gebundenem, Atto-Farbstoff-markiertem α -Fluoro-VS. (C) Auftragungen der gefitteten reziproken Ratenkonstanten des Assoziationsexperiments gegen die Enzymkonzentration. Die Steigung entspricht dem k_{on} -Wert.

In der nachfolgenden Tabelle 20 sind die kinetischen Konstanten der Bindung von α -Fluoro-Vinylsulfonen an Rhodessain aufgelistet, welche durch verschiedene Experimente erhalten wurden. Hinsichtlich ihrer Struktur ähnelten die Inhibitoren, welche in *i*SPR- (Verb. 7) und *rapid-mixing* Experimenten (Verb. 9) verwendet wurden, am ehesten Verbindung 6 aus den *kin*ITC-Versuchen. Diese Inhibitoren besitzen einen Amid-gekoppelten Linker, durch den sie ihr basisches Zentrum an der Methylpiperazin-Gruppe verloren haben.

Innerhalb dieser Reihe fällt auf, dass der kleinste k_{off} -Wert im *rapid-mixing*-Experiment bestimmt wurde. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass der Farbstoff zusätzliche Interaktionen mit dem Enzym eingeht, wodurch die Dissoziation des Inhibitors vom Enzym verlangsamt wird.

Tabelle 20: Zusammenfassung der K_D , k_{on} , und k_{off} -Werte der Bindung von α -Fluoro-Vinylsulfonen an Rhodessain aus unterschiedlichen Messmethoden.

Experiment	K_D [nM]	k_{on} [$10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$]	k_{off} [10^{-4} s^{-1}]
<i>kin</i> ITC-ETC, Verb. 2	304.5 ± 31.3	4.20 ± 1.64	128.03 ± 48.29
<i>kin</i> ITC-ETC, Verb. 6	20.3 ± 7.6	17.18 ± 6.52	34.9 ± 1.79
<i>i</i> SPR, Verb. 7	51 ± 12	9.58 ± 2.57	49 ± 12
<i>rapid-mixing</i> , Verb. 9	2.9 ± 0.3	55.0 ± 20.0	16 ± 1

4.7 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse des Abschnitts 4

In diesem Kapitel wurden unterschiedliche Methoden etabliert und angewandt, um die kinetischen und thermodynamischen Konstanten der Bindung von (α -Fluoro-)Vinylsulfonen an Rhodesain zu bestimmen.

Dazu wurden ITC-Messungen vorgenommen, in welchen sich der Enthalpie-getriebene Charakter der Rhodesain-Vinylsulfon-Bindung zeigte. Des Weiteren war der entropische Beitrag reversibler Inhibitoren stets günstiger als der ihrer irreversiblen Gegenstücke, wohingegen der enthalpische Beitrag abnahm. Zudem ließen sich in den Messungen bekannte Trends aus SAR-Studien, wie eine Affinitätssteigerung durch Verlust des positiv geladenen Methylypiperazin-Rings, wiederfinden.

Durch Anwendung der *kinITC*-ETC-Software konnten aus den ITC-Daten neben thermodynamischen Informationen auch kinetische Parameter der Bindungen bestimmt werden. Die erhaltenen Daten wurden mit Ergebnissen aus *iSPR*- und *rapid-mixing*-Experimenten verglichen. Aus dem Vergleich dieser Messungen ging hervor, dass die k_{on} - und k_{off} -Werte von Verbindung **6** eine größere Ähnlichkeit zu den Werten aus *iSPR* (Verb. **7**) und *rapid-mixing*-Versuchen (Verb. **9**) aufwiesen, als die Werte von Verbindung **2**. Dies wurde auf die stärkeren strukturellen Ähnlichkeiten zwischen den Verbindungen **6**, **7** und **9** zurückgeführt.

Darüber hinaus konnte in Kooperation mit [REDACTED] die Rhodesain-Q127W-Mutante identifiziert werden, welche bei Bindung eines Atto-Farbstoff-VS-Konjugats eine Fluoreszenzlöschung des Farbstoffs erzeugt und somit für PET-FCS-Messungen geeignet ist. In diesen Messungen zeigten sich Unterschiede in den Spektren irreversibler und reversibler Inhibitoren, welche auf abweichende Dynamiken der Inhibitoren in der Bindetasche des Enzyms zurückgeführt wurden. Da diese Effekte auf molekularer Ebene bislang schwer interpretierbar sind, wurden computergestützte Methoden von [REDACTED] in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] angewandt.

Obwohl diese Simulationen keine Erklärung der PET-FCS-Resultate auf molekularer Ebene lieferten, können sie jedoch als Ausgangspunkt für weitere Berechnungen oder Experimente dienen. Darüber hinaus bekräftigen diese Simulationen die Vermutung, dass eine Orientierung des Linkers entlang der katalytischen Tasche energetisch günstig ist und somit eine WW zwischen dem Trp127 und dem Atto-Farbstoff trotz großer Distanz ermöglicht wird.

Des Weiteren wurde eine Methode entwickelt, mit der es möglich ist, Rhodesain an artifiziellen Cystein-Seitenketten chemisch zu modifizieren, ohne dass das Enzym dabei seine katalytische Aktivität verliert. Durch diese Methode wurde die Basis für Experimente wie MST oder SPR an Rhodesain geschaffen.

Im Fall der SPR-Experimente konnte katalytisch aktives Rhodesain erfolgreich auf einem SPR-Chip immobilisiert werden. Allerdings konnten aufgrund mangelnder Sensitivität und unspezifischer Interaktionen zwischen dem SPR-Chip und den Inhibitoren keine kinetischen Informationen über Rhodesain-Inhibitor-Bindungen gewonnen werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine nicht ausreichend dichte Beladung des Chips mit der Protease sein.

Im Fall des MST-Experiments wurde eine Ligandenbindung beobachtet. Auf Grund unzureichender Sensitivität konnte jedoch keine Gleichgewichtskonstante der Rhodessain-Inhibitor-Bindung bestimmt werden.

Obwohl die SPR- und MST-Experimente weiterer Optimierung bedürfen, wurde dennoch gezeigt, dass durch die Methode der chemischen Rhodessain-Markierung die Anpassung des Enzyms an eine Vielzahl unterschiedlicher Messmethoden ermöglicht wird.

5 Vinylsulfon-RNA-Biokonjugate zur gezielten Adressierung der parasitären Cysteinprotease Rhodesain

Obwohl die Cysteinprotease Rhodesain ein vielversprechendes *target* zur Behandlung der Schlafkrankheit darstellt, birgt die Therapie mit gegen sie gerichtete Inhibitoren Risiken. Zu diesen Risiken zählen insbesondere *off-target*-Effekte (siehe 1.6), wodurch Strategien zur Minimierung dieser Effekte von hoher Relevanz sind.

Neben der Steigerung der Selektivität der Inhibitoren gegenüber der parasitären Protease, kann dieses Ziel auch durch *drug delivery*-Systeme erreicht werden, durch welche eine Substanz ihre Wirkung erst am gewünschten Zielort entfaltet. Dieser Zielort stellt bei einer Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit mit Vinylsulfon-basierten Inhibitoren das Lysosom der *T. brucei* dar, der Ort an welchem sich die Zielstruktur Rhodesain befindet. Als *drug delivery*-System könnte dabei das publizierte RNA-Aptamer 2-16 dienen, welches nach der Bindung an ein Membranprotein innerhalb der flagellaren Tasche von *T. brucei* in das Lysosom der Trypanosomen transportiert wird (siehe 1.8).^[141] Ziel dieses Projektes war es daher, Vinylsulfon-basierte Inhibitoren kovalent an ein Derivat des Aptamers 2-16 zu koppeln. Dazu wurden zunächst die Kopplungsreaktion, sowie Isolierungs- und Analysemethoden anhand von Modell-RNAs etabliert und optimiert. Im Anschluss daran wurde ein Derivat des Aptamers 2-16 durch IVT synthetisiert. Ein weiteres Ziel war der Einbau von 2'-*F*-2'-Desoxyuridinen und -cytosinen in die RNA, um dessen Serumstabilität zu erhöhen. Zuletzt sollten die Kopplungs- und Analysemethoden der Modell-RNAs auf das Aptamer übertragen und die RNA-Inhibitor-Konjugate hinsichtlich ihre inhibitorischen Wirkung gegen Rhodesain und ihrer Toxizität gegenüber Trypanosomen und Humanzellen getestet werden.

5.1 Konjugation kleiner Moleküle an RNA

Die Darstellung der RNA-Inhibitor-Konjugate sollte durch chemische Kopplung des 3'-Endes der RNA an ein freies Amin des Inhibitors erfolgen. Dazu wurde das 3'-Ende der RNA in einer Malaprade-Reaktion zu einem Dialdehyd oxidiert und durch reduktive Aminierung kovalent mit dem Inhibitor verbunden (siehe Abbildung 87).

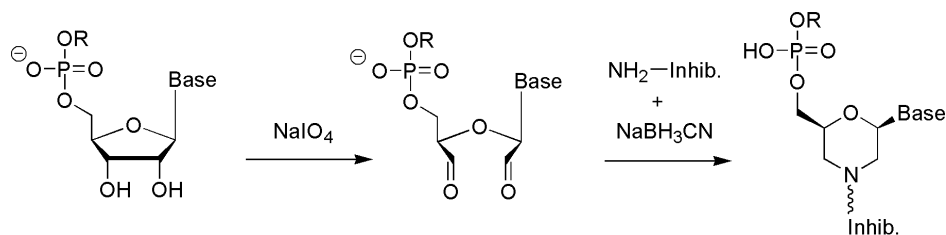


Abbildung 87: Reaktionsabfolge zur Kopplung von Inhibitoren oder anderen small molecules an RNA. Dazu wird zunächst der 3'-Terminus der RNA durch eine Malaprade-Reaktion zu einem Dialdehyden oxidiert, bevor in der zweiten Stufe die Kopplung des Inhibitors mittels reduktiver Aminierung erfolgt.

Zur Optimierung der Kopplungsreaktion wurde zunächst mit einem vereinfachten Modell gearbeitet, indem eine kürzere, kommerziell erworbene RNA anstatt des Aptamers 2-16 und ein Fluorescein-Farbstoff anstelle eines Inhibitors verwendet wurden.

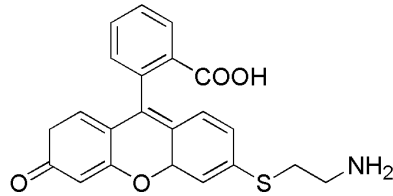


Abbildung 88: Strukturformel des Fluorescein-Derivats, welches zur Etablierung der Kopplungsreaktion genutzt wurde.

Als Modell-RNA wurde die 22 Nukleotid-lange RNA 533 mit der Sequenz 5'-GAACUUCAGGGUCAGCUUGCCG-3' und einem Molekulargewicht von 7029.95 Da verwendet. Die einzelnen Schritte der Kopplung wurden mittels PAGE analysiert. Das erhaltene Gel wurde vor dem Anfärben bei einer Emissionswellenlänge von 526 nm gescannt, um ausschließlich den Fluoreszenzfarbstoff zu detektieren (siehe Abbildung 89 B). Anschließend wurden die Nucleinsäuren mit GelRed (*Biotium*, Fremont, USA) angefärbt und das Gel erneut bei einer Emissionswellenlänge von 610 nm gescannt (siehe Abbildung 89 A). Durch die Anfärbung mit GelRed wurde überprüft, ob es während der Konjugation zu einer Degradation der RNA gekommen ist.

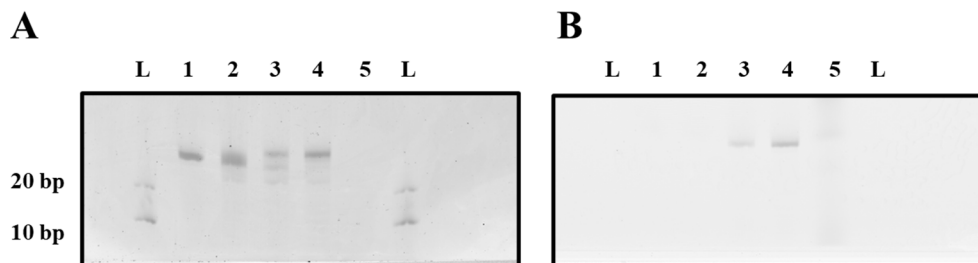


Abbildung 89: 15%iges denaturierendes PAGE-Gel der einzelnen Kopplungsschritte von Fluorescein an die RNA 533. (A) Scan nach dem Anfärben mit GelRed bei einer Wellenlänge von 610 nm. (B) Gel vor dem Anfärben bei einer Wellenlänge von 526 nm. (Die vollständigen Gele sind in Abbildung 131 im Anhang aufgeführt). Spur 1: RNA 533; Spur 2: RNA 533 oxidiert; Spur 3: Produkt der Konjugationsreaktion von RNA 533 und des Fluorescein-Derivats bei 0°C und Spur 4: RT; Spur 5: Fluorescein-Derivat. Die vollständigen Gele sind in Abbildung 131 im Anhang aufgeführt.

Wie aus der Kontrolle (Abbildung 89 A) hervorgeht, blieb die RNA während der einzelnen Kopplungsschritte stabil, da in den Spuren 1 – 4 eine Bande auf der erwarteten Laufhöhe von ~22 bp zu erkennen ist. Zudem ist in Abbildung 89 B jeweils eine Bande in den Spuren 3 und 4 zu erkennen, welche ebenfalls die selbe Laufhöhe wie die Banden in Abbildung 89 A aufweisen. Da in Abbildung 89 B nur Fluorescein detektiert wurde, kann geschlossen werden, dass es sich bei diesen Banden um das Konjugationsprodukt aus RNA 533 und dem Fluorescein-Derivat handelt. Die Negativkontrolle in Spur 5 weist in beiden Gelen keine Bande im betrachteten Größenbereich auf, weshalb eine Bande durch freien Farbstoff ausgeschlossen werden kann.

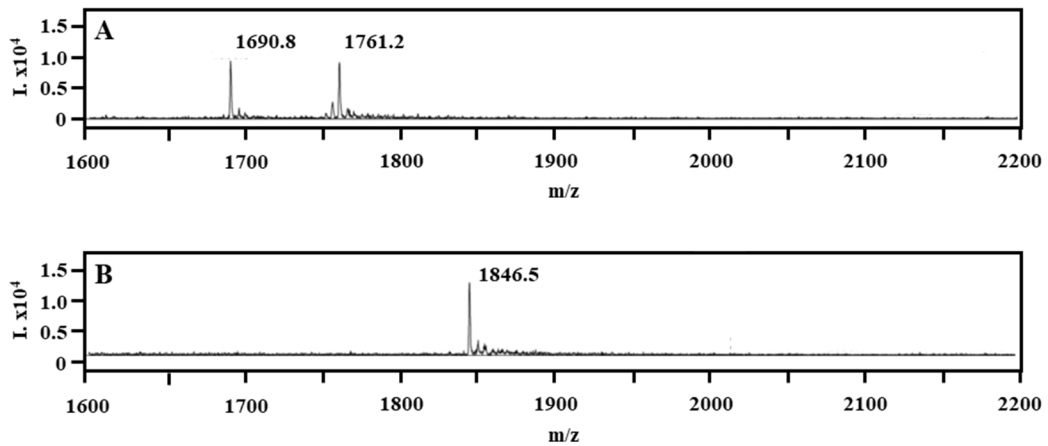


Abbildung 90: Massenspektren zweier LC-MS-Fractionen der Fluorescein-RNA-Kopplungsreaktion. (A) Massenspektrum der ersten Elutionsfraktion nach 9.6 min. Die m/z -Verhältnisse entsprechen der RNA-533 und einem Zersetzungsprodukt. (B) Massenspektrum der zweiten Elutionsfraktion nach 18.9 min. Das m/z -Verhältnis entspricht der Masse des erwarteten RNA-Fluorescein-Konjugats. (Chromatogramm siehe Abbildung 132 im Anhang).

Die Produkte der Konjugationsreaktion zwischen RNA und Farbstoff wurden anschließend mittels LC-MS analysiert. Hierfür wurde das Reaktionsgemisch über eine *ion pair-high performance liquid chromatography* (IP-HPLC)-Methode aufgetrennt und massenspektrometrisch untersucht. Dabei eluierten zwei Fraktionen nach 9.6 und 18.9 min. Die erste Fraktion nach 9.6 min absorbierte nicht bei einer Wellenlänge von 500 nm. Zudem wies diese Fraktion m/z -Verhältnisse auf, die der unmodifizierten RNA 533 ($m/z = 1761.0 \triangleq [M - 5 H + Na]^4$; $m/z_{(theo.)} = 1762.81$) sowie einem Zersetzungsprodukt bei einer vierfach negativen Ladung zugeordnet werden konnten. Das Zersetzungsprodukt wurde als RNA 533-Fragment ohne 3'-Guanosin und mit 3'-terminalen Phosphat identifiziert (Seq.: 5'-GAACUUCAGGGUCAGCUUGCCp-3'; $m/z = 1690.2 \triangleq [M - 4 H]^4$; $m/z_{(theo.)} = 1691.0$).

Im Gegensatz dazu absorbierte die zweite Elutionsfraktion nach 18.9 min bei einer Wellenlänge von 500 nm, weshalb davon ausgegangen wurde, dass es sich hierbei um das RNA-Farbstoff-Konjugat handelte (Chromatogramme siehe Abbildung 132 im Anhang). Diese Annahme wurde durch das detektierte m/z -Verhältnis von 1846.5 bestätigt, welches einer der Masse des RNA-Farbstoffkonjugats bei vierfach negativer Ladung ($m/z_{(theo.)} = 1845.85 \triangleq [M - 4 H]^4$) entspricht (siehe Abbildung 90 B).

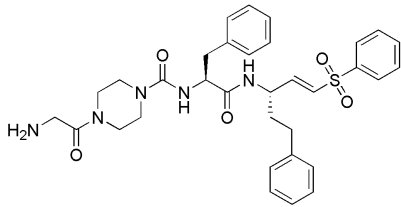
Im Anschluss an die erfolgreiche Kopplung von Modell-RNA an Fluorescein und Analyse des Konjugats wurde mit der Ligation von Inhibitoren an RNA begonnen.

5.2 Kopplung von Vinylsulfon-basierten Inhibitoren an Modell-RNA

Nach erfolgreicher Kopplung eines Fluorescein-Derivats an RNA (siehe 5.1) wurde das Protokoll auf die Konjugation von Vinylsulfonen mit Modell-RNA übertragen.

Dazu wurde zunächst die RNA 632 an den Inhibitor **10** gekoppelt und die Reaktionsprodukte mittels LC-MS analysiert. Die Massen des Inhibitors und der RNA, sowie die Sequenz bzw. Strukturformeln sind in Tabelle 21 aufgelistet. Die für diese Versuche verwendeten Inhibitoren wurden von [REDACTED] zur Verfügung gestellt.

Tabelle 21: Molekülstrukturen der Inhibitorverbindung **10**, sowie Nukleotidsequenz der verwendeten Modell-RNA und deren Molekulargewichte.

Abkürzung	Sequenz/Strukturformel	MW [Da]
RNA 632	5'-GUGCUACGCGUCAUGUCCCGAU-3'	6970.22
Verb. 10		617.3

In der LC-MS-Analyse reiner RNA 632 wurde ein Peak nach 7.4 min mit einem m/z-Verhältnis von 1741.2 eluiert (siehe Abbildung 91 A). Dieses m/z-Verhältnis stimmt bei vierfach negativer Ladung mit der Masse von RNA 632 ($m/z = 1741.2 \cong [M - 4 H]^4$; $m/z_{(\text{theo.})} = 1741.5$) überein.

Während des LC-MS-Laufs der Kopplungsreaktion zwischen RNA 632 und Verb. **10** wurden zwei Peaks eluiert (siehe Abbildung 91 A). Obwohl der erste Peak eine identische Elutionszeit wie reine RNA 632 (siehe Abbildung 91 A) von 7.4 min aufwies, konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden, dass es sich dabei um ein Zersetzungsprodukt handelte. Dieses entspricht in seinem m/z-Verhältnis einer vierfach negativ geladenen RNA 632 ohne das terminale 3'-Uridin (Seq. = 5'-GUGCUACGCGUCAUGUCCCGAp-3', $m/z = 1684.8 \cong [M - 4 H]^4$; $m/z_{(\text{theo.})} = 1685.0$).

Die zweite Fraktion nach 16.1 min wurde anhand des m/z-Verhältnisses dem Konjugationsprodukt zwischen RNA 632 und Verb. **10** zugeordnet (Seq. = 5'-GUGCUACGCGUCAUGUCCCGAU-Verb. **10**, $m/z = 1885.2 \cong [M - 4 H]^4$; $m/z_{(\text{theo.})} = 1887.38$).

Die Verschiebung der Elutionszeit des Kopplungsprodukts im Vergleich zur unbehandelten RNA lässt sich durch den apolaren Charakter des Inhibitors erklären.

Anhand der LC-MS-Läufe wurde geschlossen, dass die Modell-RNA 632 erfolgreich an ein VS konjugiert wurde und dass die Edukte bzw. Produkte mittels dieser Methode voneinander isoliert werden können.

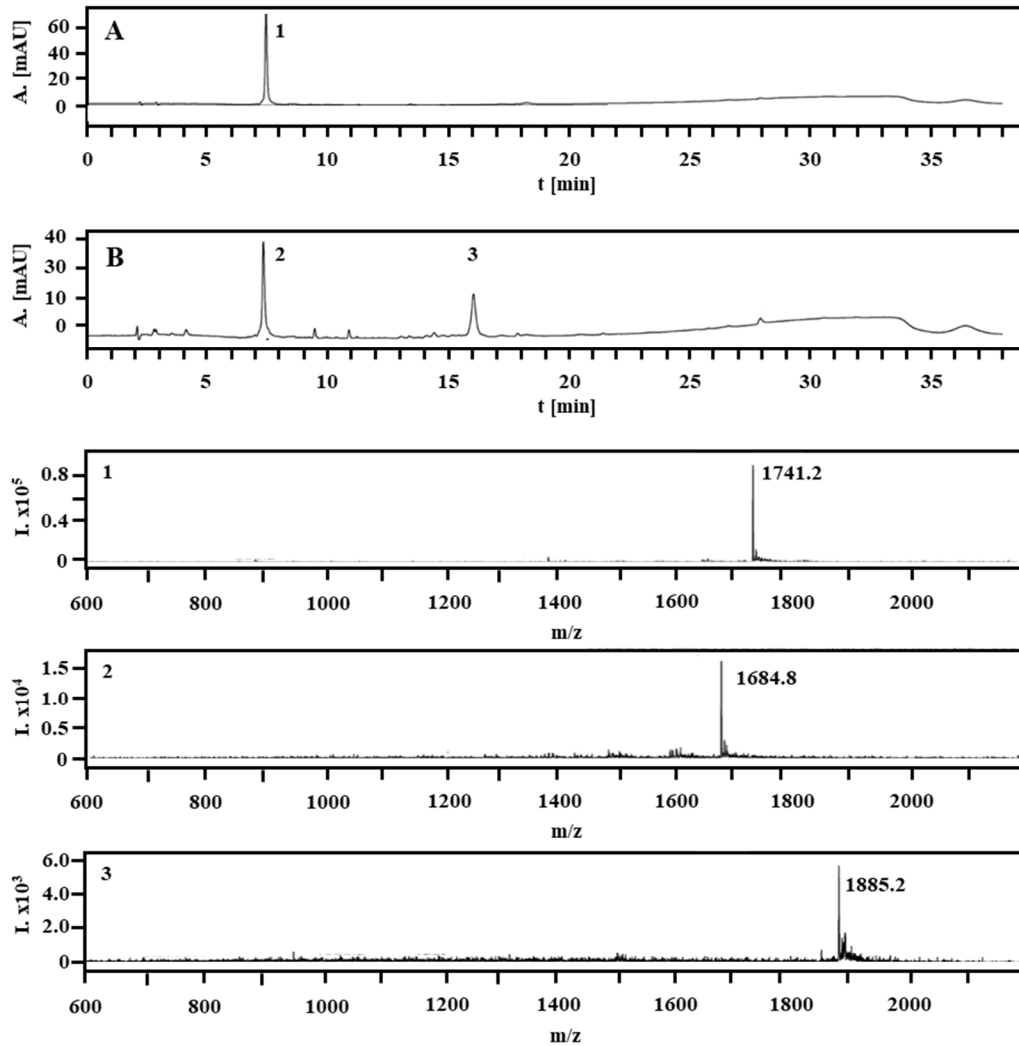


Abbildung 91: LC-MS-basierte Analyse der Kopplungsreaktion von RNA 632 und Verb. 10. Dargestellt sind die Chromatogramme der LC-MS-Läufe von unbehandelter RNA 632 (A) und des Konjugationsansatzes zwischen RNA 632 und Verb. 10 (B) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Massenspektren der einzelnen Fraktionen sind unterhalb der Chromatogramme gezeigt. Die unbehandelte RNA eluierte nach 7.4 min. Das m/z -Verhältnis entsprach dem Molekulargewicht der RNA 632 bei vierfach negativer Ladung. Im Konjugationsansatz eluierten zwei Fraktionen nach 7.4 min und 16.1 min. Dabei handelte es sich um ein Zerfallsprodukt der RNA 632 ohne 3'-Uridin mit 3'-terminalem Phosphat und um das Konjugationsprodukt aus RNA 632 mit Verb. 10.

Im Anschluss daran wurde untersucht, ob Inhibitoren nach der Konjugation an RNA weiterhin Rhodesain inhibieren können. Um die Distanz zwischen RNA und Inhibitor zu vergrößern wurde Verb. 11 verwendet, welche eine längere Linker-Funktion als Verb. 10 besitzt. Diese wurde an RNA 848 konjugiert. Da die massenspektrometrischen Daten der Läufe beschädigt wurden, muss für

die Auswertung der Kopplung zwischen Verb. **11** und RNA 848 ein Vergleich der RNA 632-Kopplung mit Verb. **10** herangezogen werden. Wie aus Tabelle 22 hervorgeht, besitzt RNA 848 die selbe Nukleotidanzahl wie RNA 632 und eine nahezu identische Masse und Anzahl der jeweiligen Nukleotide, weshalb ein vergleichbares Laufverhalten erwartet wurde (siehe Tabelle 22 und Tabelle 23). Diese Annahme konnte in LC-MS-Läufen bestätigt werden (siehe Abbildung 92 A und B).

Tabelle 22: Molekülstruktur der Inhibitorverbindung **11**, sowie Nukleotidsequenz der verwendeten Modell-RNA und deren Molekulargewichte.

Bezeichnung	Sequenz/Strukturformel	MW [Da]
RNA 632	5'-GUGCUACGCGUCAUGUCCCGAU-3'	6970.22
RNA 848	5'-UCAAGUCCCUUGUUCGGGCGCCA-3'	6969.23
Verb. 11		691.32

Tabelle 23: Anzahl der jeweiligen Nukleotide in den RNAs 632 und 848.

Bezeichnung	Adenosin	Cytidin	Guanosin	Uridin
RNA 632	3	7	6	5
RNA 848	3	7	6	5

Der LC-MS-Lauf des Konjugationsansatzes zwischen Verb. **11** und RNA 848 (siehe Abbildung 92 C) ergab dabei ein vergleichbares Ergebnis, wie der Kopplungsansatz zwischen RNA 632 und Verb. **10** (siehe Abbildung 92 A). Es eluierte erneut eine Fraktion nach 7.8 min und eine zusätzliche nach 17.3 min. Der erste Fraktion nach 7.8 min (Abbildung 92 C) weist eine vergleichbare Elutionszeit wie die unbehandelte RNA 632 und RNA 848 auf, weshalb geschlossen wurde, dass es sich dabei um nicht konjugierte RNA 848 oder ein Zersetzungsprodukt handelt. Der zweite Peak nach 17.3 min wurde dem Kopplungsprodukt zugeordnet. Wie in der Konjugation zwischen RNA 632 und Verb. **10** kam es auch hier zu einer verzögerten Elution durch den apolaren Charakter des Inhibitors. Die verschiedenen Elutionszeiten beider Konjugationsprodukte wurden auf die unterschiedlichen Strukturen der Inhibitoren zurückgeführt.

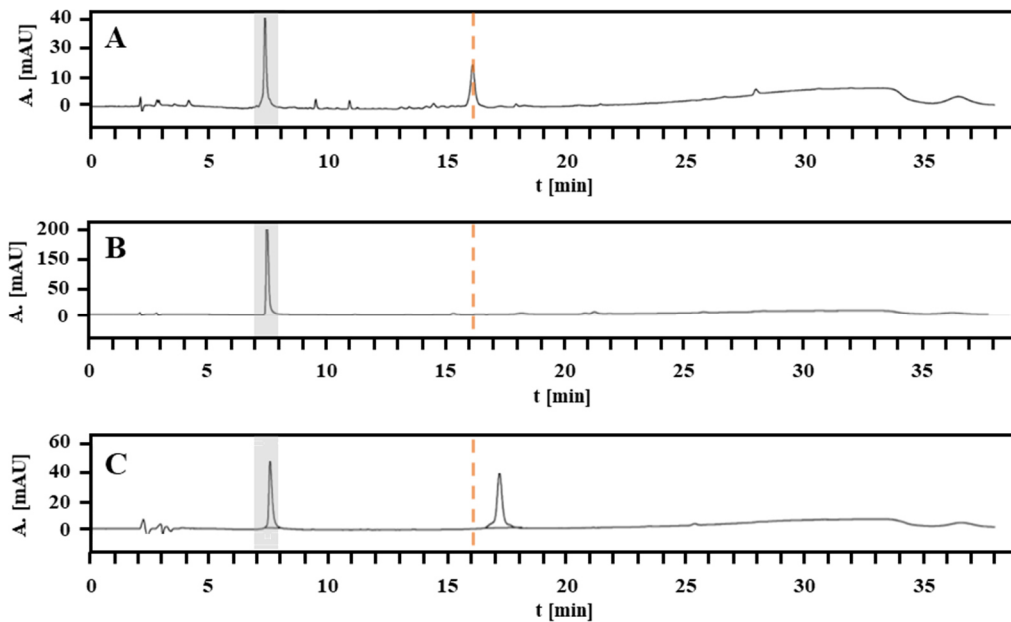


Abbildung 92: LC-MS-Analyse des Konjugationsansatzes von RNA 848 und Verb. 11. Die reine RNA 848 (B) eluiert nach 7,8 min mit einer vergleichbaren Retentionszeit wie die RNA 632 (A) mit 7,4 min. Während der Analyse des Konjugationsansatzes (C) werden zwei Fraktionen detektiert, wobei die erste Elutionsfraktion unmodifizierter oder teilweise degradierter RNA 848 zugeordnet wurde. Die zweite Elutionsfraktion eluiert mit einer starken Verzögerung, die bereits bei anderen Konjugationsprodukten beobachtet wurde (siehe Abbildung 90 und Abbildung 91). Es wird daher angenommen, dass es sich dabei um ein RNA 848-Verb. 11-Konjugationsprodukt handelt.

Die beiden LC-Fractionen der Konjugation (siehe Abbildung 92 C) wurden nach Entkopplung des Massenspektrometers aufgefangen und im fluoreszenzbasierten Enzymassay auf ihre inhibitorische Wirkung gegen Rhodesain getestet. Die Konzentration der RNA wurde durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zudem wurde der freie Inhibitor **11** bei identischer Konzentration getestet. Das nachfolgende Diagramm in Abbildung 93 zeigt die relativen katalytischen Restaktivitäten von Rhodesain, welche bei 250 nM RNA-/Inhibitor-Konzentration im *well* erhalten wurden.

Wie in Abbildung 93 A zu erkennen ist, zeigen ausschließlich der freie Inhibitor **11** und das RNA-Inhibitor-Konjugat inhibitorische Wirkung. Diese ist im Falle des freien Inhibitors mit 63,8% deutlich stärker als beim Konjugat (34,1%). Eine Erklärung dafür könnte die sterische Hinderung der RNA sein, welche eine Bindung an das Enzym erschwert oder verlangsamt.

Als weitere Kontrolle wurde die Stabilität der RNA unter Assaybedingungen überprüft. Dazu wurde die RNA für 30 min bei Raumtemperatur in Assaypuffer, in Assaypuffer mit Rhodesain und in Assaypuffer mit Substrat inkubiert und die Ansätze anschließend mittels PAGE analysiert (siehe Abbildung 93 B). In allen drei Fällen kam es zu einer minimalen RNA-Degradation. Da ein Zeitraum von 30 min allerdings nur zu einem geringen Abbau führte, wurde angenommen, dass dieser zu langsam ist, um die Ergebnisse des Enzymassays maßgeblich zu beeinflussen.

Somit konnten Vinylsulfon-basierte Inhibitoren erfolgreich an Modell-RNA gekoppelt und eine inhibitorische Wirkung gegen Rhodesain im fluoreszenzbasierten Enzymassay nachgewiesen werden.

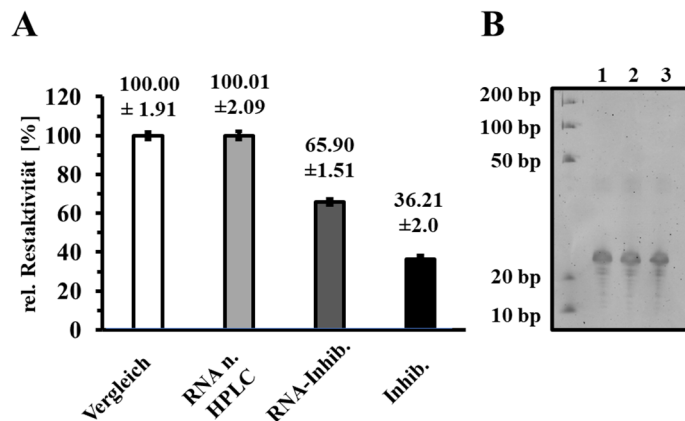


Abbildung 93: Untersuchung der inhibitorischen Wirkung des RNA 848-Verb.11-Konjugationssprodukts mittels fluoreszenzbasiertem Enzymassays. (A) Relative katalytische Restaktivitäten von Rhodesain nach Inkubation mit ungekoppelter RNA (Abbildung 92 C, 1. Fraktion), freiem Inhibitor **11** und gekoppelter RNA (Abbildung 92 C, 2. Fraktion) bei jeweils 250 nM Konzentration. Als Vergleich wurde reines DMSO verwendet. (B) 15%iges denaturierendes PAGE-Gel. Aufgetragen wurde nicht-modifizierte RNA, welche zuvor für 30 min bei RT mit Assaypuffer (Spur 1), Assaypuffer + Rhodesain (Spur 2) und Assaypuffer + Substrat (Spur 3) inkubiert wurde. Die Hauptbanden zeigen die erwartete Laufhöhe von 22 bp. Dabei ließen sich geringfügige Mengen an Degradationsprodukten erkennen. Das vollständige PAGE-Gel befindet sich unter Abbildung 130 E im Anhang.

5.3 Kombination aus RNase T1-Verdau und LC-MS zur Analyse großer RNA

Die verwendeten Modell-RNAs und ihre Inhibitor-Konjugate konnten auf Grund ihrer relativ geringen molaren Masse direkt durch *electrospray ionization-mass spectrometry* (ESI-MS) analysiert werden. Im Gegensatz dazu ließ sich diese Methode nur indirekt durch Verwendung von RNase T1 auf die Derivate des Aptamers 2-16 mit vergleichsweise hohen molaren Massen und deren Konjugationsprodukte anwenden.

RNase T1 hydrolysiert einzelsträngige RNA spezifisch am 3'-Ende von Guanosin-Einheiten, wodurch definierte RNA-Fragmente mit verringertem Molekulargewicht erhalten werden.^[168] Diese lassen sich anschließend mittels LC-MS auftrennen und analysieren.

In Vorversuchen wurde daher zunächst eine Methode zu Auftrennung kleinerer RNA-Fragmente und deren Nachweis etabliert. Dazu wurden kommerzielle RNAs unterschiedlicher Länge gemischt und mittels LC-MS analysiert. Die Sequenzen und Molekulargewichte der verwendeten RNAs sind in Tabelle 24 aufgelistet; Retentionszeiten, sowie die m/z-Verhältnisse, welche in der LC-MS bestimmt wurden, sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 24: Molekulargewichte und Sequenzen der verwendeten RNAs.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	MW [Da]
RNA 995	UUUAUUU	2104.25
RNA 996	UUUUAUUUU	2715.59
RNA 206	GGUACCCAAAAU	3802.38
RNA 847	UCUGAGGGUCCAGGG	4844.97
RNA 848	UCAAGUCCCUGUUCGGGCGCCA	6968.23

Tabelle 25: Ladungen und Retentionszeiten, Zahl der Nukleotide N, sowie gemessene und theoretische m/z-Verhältnisse der verwendeten RNAs. Die zugehörigen Chromatogramme bzw. Massenspektren des LC-MS-Laufs sind in Abbildung 133 im Anhang aufgeführt.

Bezeichnung	N	Retentionszeit [min]	Ion	m/z	m/z (theo.)
RNA 995	7	11.4	[M -2 H] ²⁻	1050.7	1051.12
RNA 996	9	13.2	[M -4 H] ²⁻	1357.1	1357.29
RNA 206	12	15.7	[M -3 H] ³⁻	1266.2	1266.45
RNA 847	15	16.6	[M -7 H] ⁷⁻	691.3	691.41
RNA 848	22	18.2	[M -9 H] ⁹⁻	773.3	773.35

Nach erfolgreicher Auftrennung des RNA-Gemisches, wurde RNA 848 durch RNase T1 verdaut und die erhaltenen Fragmente mittels LC-MS analysiert. Die erwarteten Massen der Fragmente wurden durch das Online-Tool *Mongo Oligo Mass Calculator* (Version v.2.08 <https://mods.rna.albany.edu/masspec/Mongo-Oligo>) berechnet. In der nachfolgenden Tabelle 26 sind die Sequenzen der Fragmente, sowie deren Retentionszeiten und MS-Signale aufgelistet. Dabei wurden alle erwarteten Fragmente des RNase T1-Verdaus von RNA 848 mit Ausnahme der Einzelnukleotide nachgewiesen, weshalb diese Methode für die Analyse des RNA-Aptamers 2-16-Derivats verwendet wurde (siehe 5.5).

Tabelle 26: Retentionszeiten, m/z-Verhältnisse und zugehörige Ladungen der Fragmente des RNase T1-Verdaus von RNA 848. Die RNA-Fragmente wurden als 3'-terminale Cyclophosphate (>p-3') identifiziert. Die zugehörigen Chromatogramme bzw. Massenspektren des LC-MS-Laufs sind in Abbildung 134 im Anhang aufgeführt.

Position	Sequenz	Retentionszeit	m/z	m/z (theo.)	Massen
U1 – G5	5'-UCAAG>p-3'	12.3	815.1	815.106	[M -2 H] ²⁻
U6 – G11	5'-UCCCUG>p-3'	12.7	944.1	944.107	[M -2 H] ²⁻
U12 – G15	5'-UUCG>p-3'	10.2	639.0	639.066	[M -2 H] ²⁻
G16	Gp	---	---	363.057	[M -1 H] ¹⁻
G17	G	---	---	363.057	[M -1 H] ¹⁻

5.4 Synthese des RNA-Aptamer 2-16 Derivats

Für die Synthese der 2-16-RNA-Derivats wurde ein Plasmid-basierter Ansatz für die *in vitro transcription* (IVT) gewählt. Die Auswahl bzw. der Entwurf des *template*-Plasmiden erfolgte nach den folgenden Kriterien:

- Es lässt sich in *E. coli* amplifizieren
- Es handelt sich um ein *high copy*-Plasmid
- Die Transkription von RNA 2-16 erfolgt durch eine T7-RNA-Polymerase
- Es befindet sich kein zusätzlicher T7-Promotor auf dem Plasmiden
- Das 3'-Ende der transkribierten RNA endet mit Adenin oder Guanodin und besitzt eine entsprechende Restriktionsschnittstelle
- Das Restriktionsenzym ist kommerziell erhältlich
- Die entsprechende Restriktionsschnittstelle kommt nicht innerhalb der 2-16-RNA Sequenz vor.

Basierend auf diesen Vorgaben wurde das *high copy*-Plasmid pUC-19 gewählt, in welches die 2-16-RNA Sequenz *downstream* zu einem T7-Promotor inkloniert wurde. Diese schloss mit einer *AseI*-Erkennungssequenz ab (siehe 8.16). In der nachfolgenden Abbildung 94 sind die einzelnen Schritte der RNA-Synthese schematisch dargestellt.

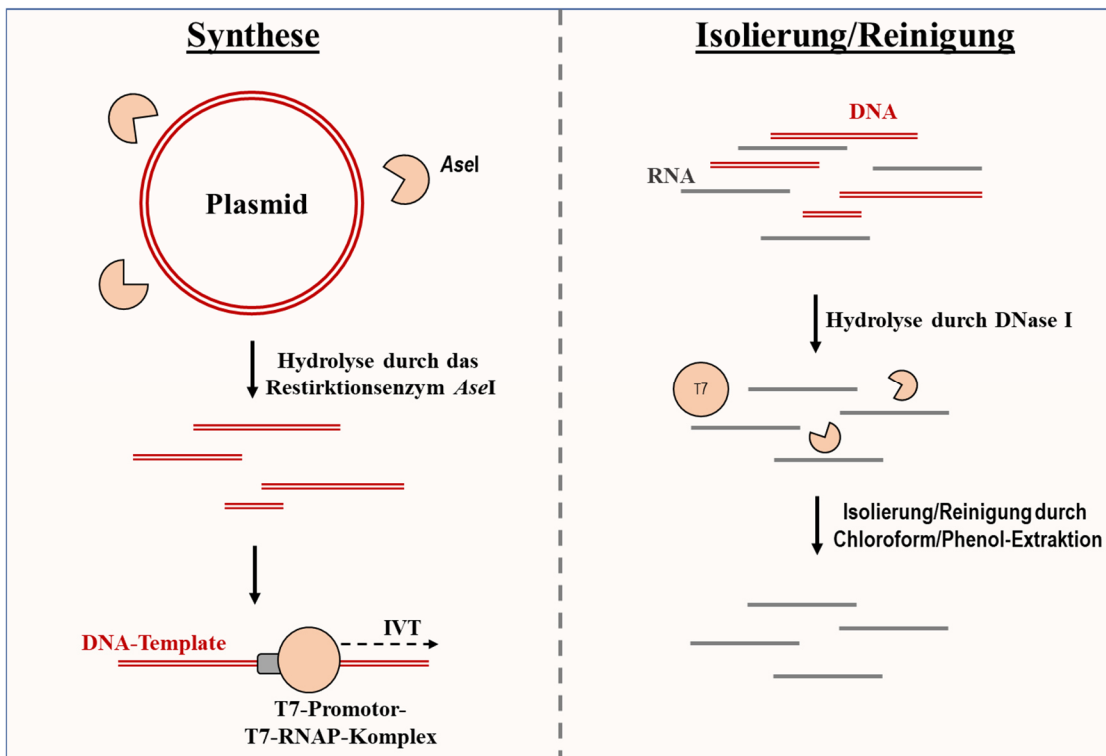


Abbildung 94: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der RNA-Synthese. Die Synthese beginnt mit der Hydrolyse des template-Plasmiden in vier definierte Fragmente. Von diesen Fragmenten besitzt nur eines einen T7-Promotor, welcher für die *in vitro* transcription (IVT) durch die T7-RNA-Polymerase (T7-RNAP) benötigt wird. Die Aufreinigung des IVT-Produkts geschieht nach vollständiger Hydrolyse des DNA-templates durch DNase I mittels Chloroform/Phenol-Extraktion.

Für die RNA-Synthese wurde das Plasmid zunächst durch das Restriktionsenzym *AseI* hydrolysiert. Dieser Verdau führt zu vier DNA-Strängen mit 59, 135, 1235 und 1330 bp. Da von diesen Hydrolyseprodukten nur Letzteres einen T7-Promotor enthält, konnte ausschließlich das 1330 bp-Fragment während der anschließenden *in vitro transcription* (IVT) von der T7-RNA-Polymerase (T7-RNAP) transkribiert werden (siehe Abbildung 95). Zudem resultiert die Hydrolyse durch *AseI* innerhalb der 5'-AT|TAAT-3'-Sequenz in *sticky ends* mit einem 5'-Überhang am codogenen Strang der *template*-DNA, wodurch nach vollständiger *run-off transcription* ein Konstrukt mit Adenosin als terminalem Nukleotid entsteht (siehe Abbildung 95).^[141]

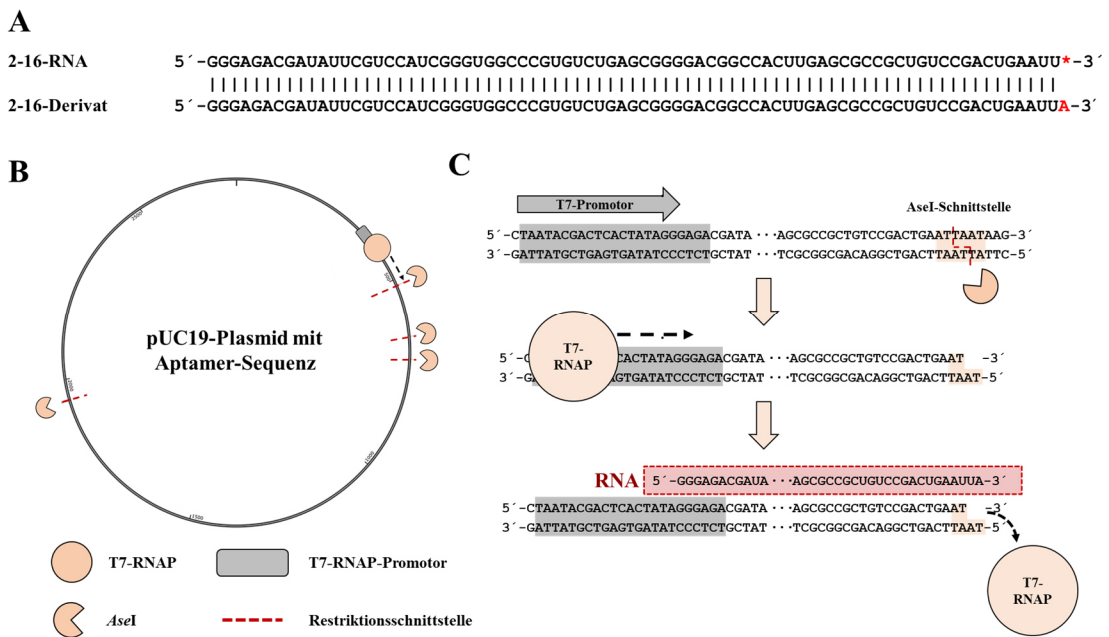


Abbildung 95: Schematische Darstellung des *AseI*-Verdau und anschließender *run-off in vitro transcription* (IVT). (A) Vergleich zwischen dem publizierten RNA-Aptamer 2-16 und dem synthetisierten Aptamer-Derivat mit zusätzlichem 3'-terminalen Adenosin (Rot).^[141] (B) Das Plasmid-template wird durch das Restriktionsenzym *AseI* an vier Stellen spezifisch hydrolysiert, wodurch vier lineare DNA-Stränge erhalten werden. Von diesen trägt nur ein Strang einen T7-Promotor, welcher für die anschließende Transkription benötigt wird. (C) Ausschnitt des linearisierten templates. Durch die *AseI*-Hydrolyse entsteht ein 5'-Überhang in sense-Richtung des templates. Während der *run-off transcription* wird dieser transkribiert.

Nach abgeschlossener IVT wurde das Plasmid unter Verwendung von DNase I vollständig hydrolysiert und die RNA durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert. Die Produkte des Plasmid-*AseI*-Verdau, sowie der IVT mit anschließendem DNase I-Verdau wurden mittels PAGE analysiert (Abbildung 96). In Spur 2 und 3 wurde das Ergebnis des pUC-19 *AseI*-Verdau in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Die Banden der vier Restriktionsprodukte, welche auf den erwarteten Höhen von ~60, ~140 und 1200 – 1400 bp liefen, sind deutlich zu erkennen. In Spur 1 ist das IVT-Produkt aufgetragen. Hierbei lief die Bande des RNA-Produkts nicht auf der erwarteten Höhe von 78 bp, sondern deutlich höher. Dies wurde auf ein unterschiedliches Laufverhalten von RNA und DNA-Marker zurückgeführt.

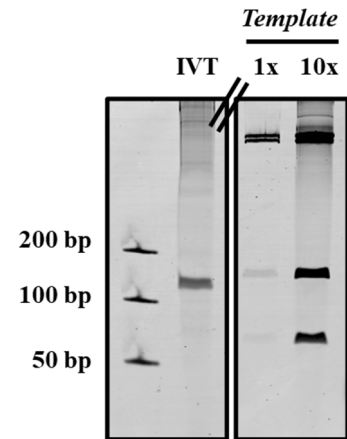


Abbildung 96. 12%iges denaturierendes PAGE-Gel des *AseI*-verdauten template-Plasmiden und des IVT-Produkts. (Vollständiges PAGE-Gel siehe Anhang Abbildung 130 A).

5.5 LC-MS basierte Analyse des IVT-Produkts

Zur Kontrolle des IVT-Produkts wurde die RNA mittels LC-MS untersucht. Da die synthetisierte RNA ein berechnetes Molekulargewicht von 24,34 kDa aufwies, konnte sie nicht direkt massenspektrometrisch erfasst werden. Stattdessen wurde zunächst, wie unter 5.2 beschrieben, ein RNase T1-Verdau durchgeführt und die entstandenen Fragmente mittels LC-MS untersucht. Die erwarteten Fragmentmassen wurden mit Hilfe des Online-Tools *Mongo Oligo Mass Calculator* berechnet und mit den erhaltenen Daten des LC-MS-Laufs verglichen.

pos	mass	3'>p	sequence	pos	mass	3'>p	sequence
G1:G1	363.057	345.047	Gp	C40:G41	668.098	650.088	CGp
G2:G2	363.057	345.047	Gp	G42:G42	363.057	345.047	Gp
G3:G3	363.057	345.047	Gp	G43:G43	363.057	345.047	Gp
A4:G5	692.109	674.099	AGp	G44:G44	363.057	345.047	Gp
A6:G8	997.150	979.140	ACGp	A45:G47	997.150	979.140	ACGp
A9:G15	2244.277	2226.267	AUAUUCGp	G48:G48	363.057	345.047	Gp
U16:G22	2219.282	2201.272	UCCAUCGp	C49:G55	2219.282	2201.272	CCAUCGp
G23:G23	363.057	345.047	Gp	A56:G57	692.109	674.099	AGp
G24:G24	363.057	345.047	Gp	C58:G59	668.098	650.088	CGp
U25:G26	669.082	651.072	UGp	C60:G62	973.139	955.129	CCGp
G27:G27	363.057	345.047	Gp	C63:G65	974.123	956.113	CUGp
C28:G31	1278.180	1260.170	CCCGp	U66:G69	1279.164	1261.154	UCCGp
U32:G33	669.082	651.072	UGp	A70:G73	1303.175	1285.165	ACUGp
U34:G37	1280.148	1262.138	UCUGp	A74:A78	1537.216		AAUUA
A38:G39	692.109	674.099	AGp				

Abbildung 97: Auflistung der berechneten Fragmentmassen des RNase T1-verdauten 2-16-RNA-Derivats. Die in der LC-MS-Analyse wiedergefundenen Massen sind hervorgehoben und das 3'-terminale Fragment rot markiert. Die zugehörigen Chromatogramme und Massenspektren sind in

Abbildung 135 im Anhang aufgeführt.

Tabelle 27: Retentionszeiten, m/z-Verhältnisse und zugehörige Ladungen der Fragmente des RNase T1-Verdau des 2-16-RNA-Derivats.

Position	Sequenz	Retentionszeit[min]	m/z	m/z (theo.)	Massen
A9 – G15	5'-AUAUUCG-3'	13.6	1121.6	1121.2	[M -2 H] ²⁻
U16 – G22	5'-UCCAUCG-3'	13.1	1109.1	1108.6	[M -2 H] ²⁻
C49 – G55	5'-CCAUCG-3'	13.1	1109.0	1108.6	[M -2 H] ²⁻
A70 – G73	5'-ACUG-3'	10.6	650.6	650.59	[M -2 H] ²⁻
A74 – G78	5'-AAUUA-3'	9.6	767.6	767.61	[M -2 H] ²⁻

Wie in Abbildung 97 dargestellt, konnten nur Fragmente detektiert werden, welche aus mindestens vier Nukleotiden bestanden. Insgesamt konnten somit die Fragmente A9 – G15, U16 – G22, C49 – G55, A70 – G73 und A74 – A78 nachgewiesen werden. Letzteres entspricht dem 3'-Terminus der

synthetisierten RNA, der als einziges eine theoretische Masse von 1537.22 Da besitzt ($m/z = 767.6 \triangleq [M - 2 H]^{2-}$; $m/z_{(\text{theo.})} = 767.9$). Der 5'-Terminus konnte nicht nachgewiesen werden, was auf die Abfolge von drei Guanosinen zurückgeführt wurde, welche nach dem RNase T1-Verdau als Mononukleotide vorliegen müssten. Da die T7-RNAP jedoch eine hohe Selektivität gegenüber ihrem Promotor aufweist, wurde ein Transkriptionsstart an einer unspezifischen Stelle als unwahrscheinlich angesehen.^[169] Somit liegt die Vermutung nahe, dass die IVT vollständig ablief und dass es sich bei der erhaltenen RNA um das erwartete Derivat des RNA-Aptamers 2-16 handelte.

Das unmodifizierte RNA-Aptamer 2-16 besitzt nur eine geringe Serumstabilität und ist somit für klinische Anwendungen ungeeignet.^[144] Um eine verbesserte Stabilität zu erzielen, wurde sie daher durch den Einbau von 2'-F-2'-Desoxyuracil- und 2'-F-2'-Desoxycytosin modifiziert. Da die WT-T7-RNAP diese Nukleotide jedoch nicht toleriert, wurde zunächst eine Y639F-Mutation in die Polymerase eingeführt.^{[170][171]}

Ein Vergleich der Produkte von WT und Y639F-Mutante mit rNTPs zeigt, dass beide Polymerasen RNAs mit identischem Laufverhalten synthetisieren (siehe Abbildung 98 A). Da nur die Y639F-Mutante modifizierte Nukleotide toleriert, konnte 2'-F-2'-Desoxy-Uracil/Cytidin-modifizierte RNA nur unter Verwendung der Mutante erhalten werden (siehe Abbildung 98 B). Diese modifizierte RNA zeigt zudem das gleiche Laufverhalten in der PAGE wie unmodifizierte RNA (siehe Abbildung 98 C).

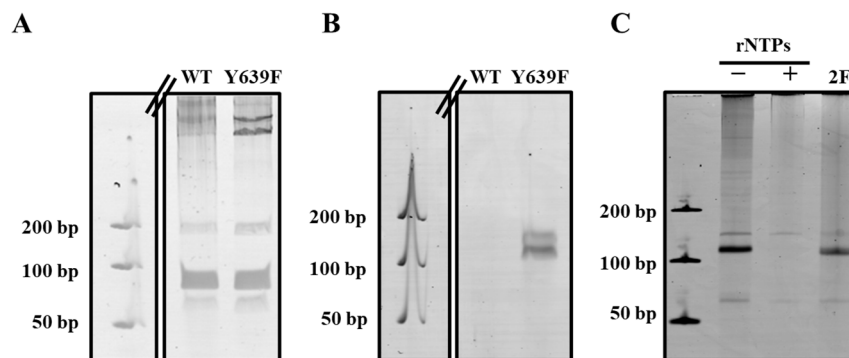


Abbildung 98: Analyse der IVT-Produkte der Y639F-T7-RNAP mittels 12%iger PAGE-Gele. (A) Vergleich der IVT-Produkte von WT- und Y639F-T7-RNAP. Die Produkte beider Polymerasen zeigen ein identisches Laufverhalten. (B) Vergleich der IVT-Produkte von WT-T7-RNAP und der Y639F-Mutante unter Verwendung von 2'-F-2'-Desoxy-CTP/UTP anstelle von UTP/CTP. Ein IVT-Produkt wurde nur unter Verwendung der Y639F-Mutante erhalten. (C) Vergleich des Laufverhaltens von modifizierter (2F) und nicht modifizierter (rNTPs) RNA, die durch die Y639F-Mutante synthetisiert wurden. Der Kontrollverdau mit RNase A (+) zeigt, dass es sich dabei um das RNA-Produkt handelt. Bei den übrigen schwachen Banden handelt es sich erneut um Reste des AseI-Verdau. Die vollständigen PAGE-Gele befinden sich unter Abbildung 130 B – D im Anhang

Somit wurde nicht nur ein Protokoll zur Synthese des 2-16-RNA-Aptamers etabliert, sondern auch die Modifikation der RNA mit 2'-F-modifizierten Nukleotiden durch das Einführen der Y639F-Mutation in die T7-RNAP ermöglicht.

5.6 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse von Abschnitt 5

Ziel dieses Projekts war, Vinylsulfon-basierte Inhibitoren kovalent an ein Derivat des RNA-Aptamers 2-16 zu koppeln, um ein potenzielles Organell-spezifisches *drug delivery*-System zu entwickeln. Die dazu notwendigen Protokolle wurden zunächst an kürzeren, kommerziellen Modell-RNAs etabliert.

Zu diesen Protokollen zählte die Konjugation von *small molecules* an den 3'-Terminus der RNA, welche zuvor in einer Malaprade-Reaktion oxidiert wurde. Im Verlauf dieser Vorversuche wurden sowohl Farbstoff- als auch Inhibitormoleküle erfolgreich an RNA gekoppelt und mittels PAGE- oder LC-MS-gestützter Methoden analysiert. Zudem wurde das RNA 848-Verb. **10** -Konjugat isoliert und dessen inhibitorische Wirkung im fluoreszenzbasierten Enzymassay nachgewiesen.

Zudem wurde ein Derivat der 2-16-RNA durch IVT synthetisiert. Die erhaltene RNA konnte durch eine Kombination aus RNase T1-Verdau und LC-MS analysiert werden. Weiterhin wurde der Einbau von 2'-*F*-2'-Desoxynukleotiden anstelle von rNTPs durch das Einfügen einer Y639F-Mutation in die T7-RNA-Polymerase ermöglicht. Da die erhaltene 2'-*F*-2'-Desoxy-U/C-RNA in der Gelelektrophorese das gleiche Laufverhalten wie nicht-modifizierte RNA zeigt, wurde gefolgert, dass auch die modifizierte RNA erfolgreich synthetisiert wurde. Allerdings konnte bislang kein Konjugat aus dem 2-16-Derivat und einem *small molecule* generiert bzw. nachgewiesen werden. Ein Grund dafür könnten Verunreinigungen aus der Synthese des Aptamers sein, welche sich nicht durch Chloroform/Phenol-Extraktion oder Fällungsschritte entfernen ließen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Grundlagen für die Darstellung eines RNA-VS-Konjugats durch die Etablierung von Synthese-, Kopplungs- und Analyse-Protokollen geschaffen wurden.

6 Rhodesain zeigt eine unerwartete Esteraseaktivität

Die klassischen *warheads* kovalenter Inhibitoren umfassen Michael-Systeme, dreigliedrige Heterozyklen und andere elektrophile Gruppen wie Aldehyde und Ketone. Sie sind im Allgemeinen umfassend untersucht.^{[121][172][173][174][175][176]} Aromatische *warheads*, welche eine S_NAr -Reaktion mit den nukleophilen Seitenketten des aktiven Zentrums eingehen können, finden hingegen selten Anwendung und sind in der Literatur kaum beschrieben. Das Potential solcher *warheads* als mögliche *building blocks* wurde daher in einer Kooperation von Arbeitskreisen unterschiedlicher Forschungsbereiche untersucht. Dabei wurde von [REDACTED] eine Reihe von Substanzen synthetisiert, welche aus einer literaturbekannten, dipeptidischen Substratsequenz von Rhodesain und aus einem aromatischen *warhead* aufgebaut waren (siehe Abbildung 99).^[177] Die aromatischen Systeme dieser möglichen Inhibitoren waren an unterschiedlichen Positionen mit stark elektronegativen Gruppen und potenziellen Abgangsgruppen wie Chlorid oder Fluorid substituiert.

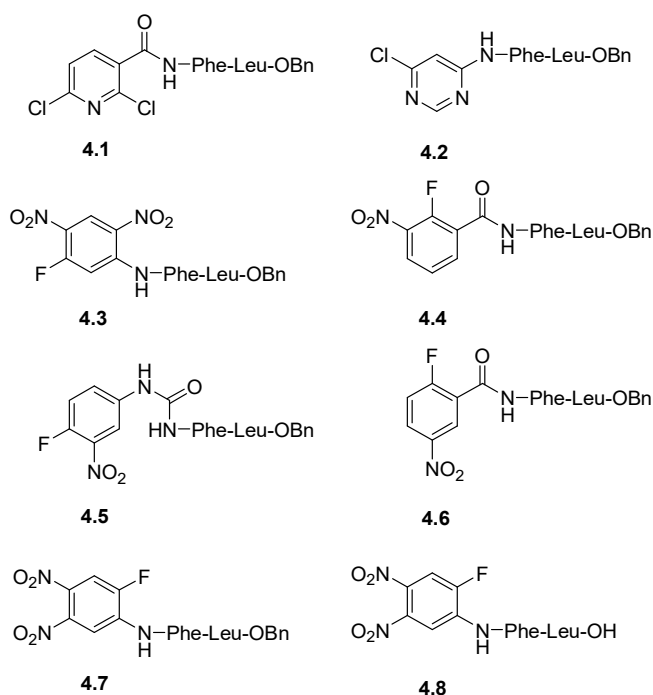


Abbildung 99: Reihe an Inhibitoren, bei welchen eine S_NAr -Reaktion mit dem katalytischen Thiolat von Mitgliedern der Papain-Familie theoretisch möglich ist. (Diese Abbildung wurde aus Molecules **2020**, 25, 1–23 entnommen).^[178]

Zudem wurden von [REDACTED] Versuche durchgeführt, in welchen sich zeigte, dass der Ester 4.7 eine S_NAr -Reaktion mit Phenylethanthiol im basischen Milieu eingeht und somit als aromatischer *warhead* fungieren könnte. In diesen Versuchen imitierte das Phenylethanthiol das katalytische Cys131 (Cys25) der Proteasen und substituierte die 2-Fluoro- oder die 5-Nitro-Gruppen (siehe Abbildung 100).

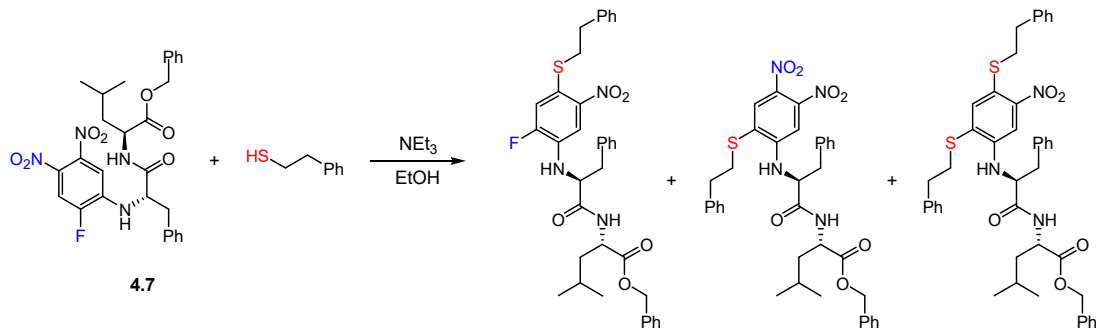


Abbildung 100: Produkte, die in einer S_NAr -Reaktion zwischen Phenylethanthiol und Verbindung **4.7** nachgewiesen wurden.

In einer anfänglichen Untersuchung im fluoreszenzbasierten Enzymassay zeigten die Substanzen zunächst nur geringe inhibitorische Wirkung und Selektivität innerhalb der Proteasen hCathL, hCathB und Rhodesain (siehe Tabelle 28). Die Inhibition dieser Substanzen konnte zudem als kompetitiv beschrieben werden, da eine Erhöhung der Substratkonzentration zu einer Steigerung des IC_{50} -Werts führte. Zudem wurde keine Zeitabhängigkeit beobachtet.

Tabelle 28: Inhibition von Rhodesain durch Verbindungen mit potenziellen aromatischen warheads. Aufgelistet sind die Inhibitionen der Substanzen 20 μ M Inhibitorkonzentration [%] oder die bestimmten K_i -Werte [μ M] (fett).

Verb.	hCathL	hCathB	Rhodesain	DENV PR
4.1	57%	16%	nd	19%
4.2	56%	33%	nd	24%
4.3	60%	22%	nd	28%
4.4	0.66	20%	0.29	10%
4.5	8%	10%	nd	11%
4.6	50%	21%	nd	12%
4.7	1.6	4.4	45%	31%

Um ein mögliches kovalentes Enzym-Inhibitor-Produkt zu identifizieren, wurde Rhodesain mit den potentesten Inhibitoren (**4.4** und **4.7**) inkubiert und von [REDACTED] eine *whole protein mass analysis* durchgeführt. In diesen Versuchen wurde das m/z -Verhältnis von WT-Rhodesain vor und nach der Inkubation mit den Inhibitoren bestimmt (siehe Abbildung 101). Dabei wurde jeweils eine Verschiebung des Molekulargewichts der Protease festgestellt, welche den Massen der Inhibitoren abzüglich der terminalen Benzylgruppen entsprach. Als mögliche Erklärung für diese Beobachtung wurden daher Verunreinigungen mit Esterasen oder eine Esteraseaktivität des Rhodesains diskutiert.

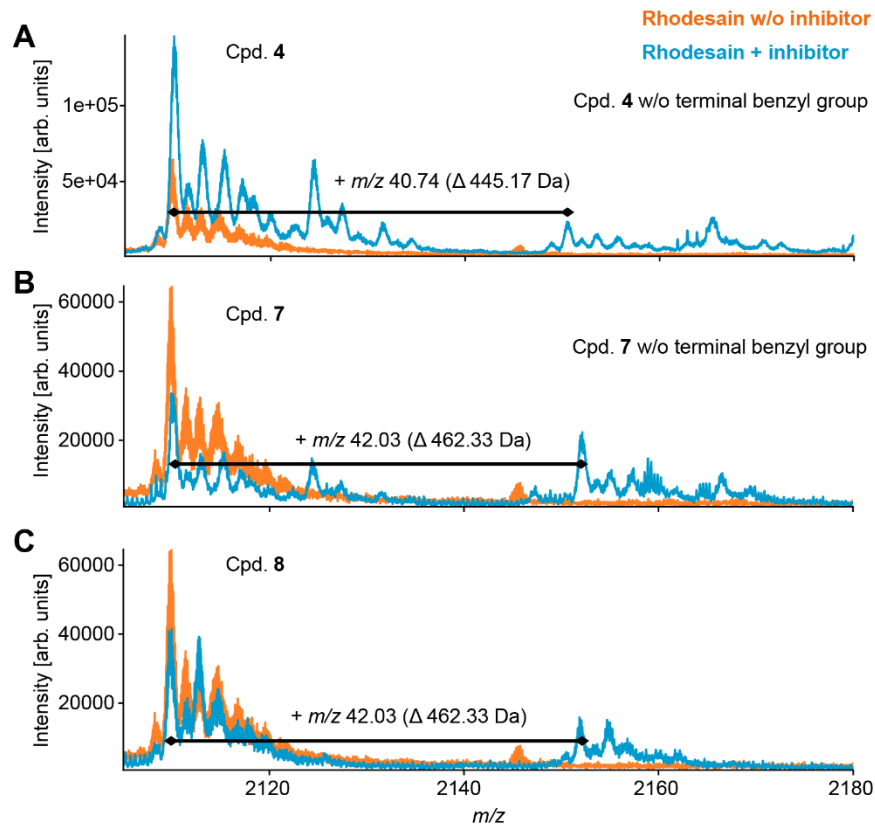


Abbildung 101: Massenspektren von Rhodesain vor (Orange) und nach (Blau) der Inkubationen mit den Verbindungen **4.4** (A), **4.7** (B) und **4.8** (C). Differenzen der m/z-Verhältnisse und den daraus resultierenden Massen sind durch Pfeile angedeutet. Im Fall des Esters **4.7** und dessen freier Säure **4.8** wurde dieselbe Differenz detektiert. (Diese Abbildung wurde aus *Molecules* **2020**, *25*, 1–23 entnommen).^[178]

Um die Möglichkeit einer Esteraseaktivität von Rhodesain oder anderen CathL-Proteasen zu überprüfen, wurde Verbindung **4.7** jeweils mit Rhodesain aus *P. pastoris*, Rhodesain aus *E. coli*, inaktivem Rhodesain-C131A, mit K11777 irreversibel inhibiertem Rhodesain, Papain und hCathL inkubiert. Als Standard und Kontrolle dienten die Verbindung **4.7** und die freie Säure **4.8**, welche in Puffer inkubiert wurden. Die Ansätze wurden mittels LC-MS untersucht, wobei sich zeigte, dass **4.7** durch Rhodesain, hCathL und Papain zu Verb. **4.8** umgesetzt wird (siehe Abbildung 102). Nicht umgesetzte Verbindung **4.7** und das Hydrolyseprodukt **4.8** eluierten identisch zu den Vergleichssubstanzen bei ($t(4.8) = 0.9$ min; $t(4.7) = 2.1$ min). Die detektierten m/z-Verhältnisse entsprachen den theoretischen Massen ($m/z = 553.3 \triangleq [M_{4.7} + H]^+$, $m/z = 575.4 m/z \triangleq [M_{4.7} + Na]^+$, $m/z = 463.3 \triangleq [M_{4.8} + H]^+$, $m/z = 485.3 \triangleq [M_{4.8} + Na]^+$). Im Gegensatz dazu erfolgte keine Umsetzung durch die inaktive Rhodesain-C131A-Mutante, Puffer oder durch K11777-inhibiertes Rhodesain. Die Hydrolyse von Verb. **4.7** zu **4.8** wurde daher auf die Esteraseaktivität der Proteasen zurückgeführt.

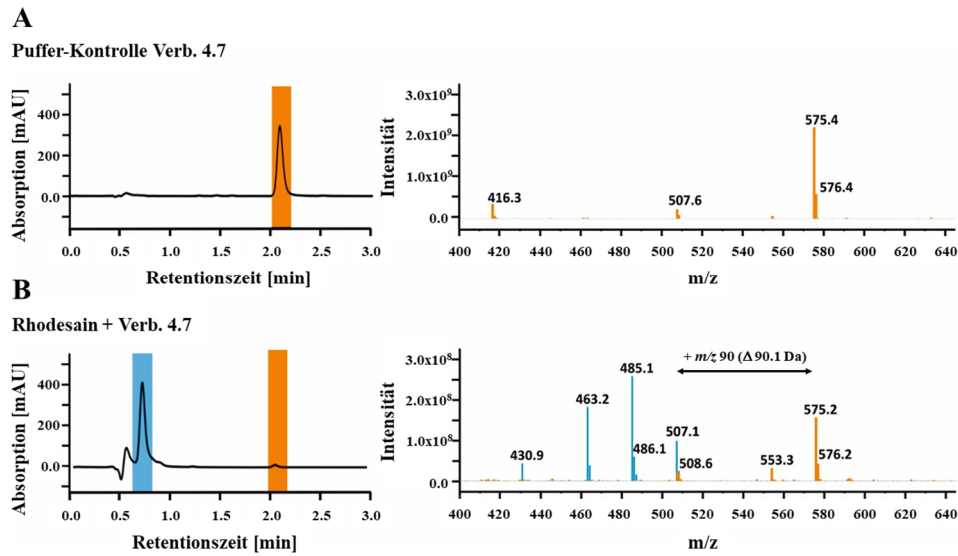


Abbildung 102: Chromatogramme und Massenspektren der LC-MS-Läufe von Verbindung **4.7** nach Inkubation in Puffer (**A**) oder Inkubation mit Rhodesain (**B**). Signale, welche Verb. **4.7** zugeordnet wurden, sind in Orange und die des Hydrolyseprodukts **4.8** sind in Blau dargestellt. Die Massendifferenz von 90 Da entspricht der Massendifferenz zwischen Ver.**4.7** und **4.8**. Die übrigen Spektren sind im Anhang unter 10.4 abgebildet. (Diese Abbildung wurde aus Molecules **2020**, *25*, 1–23 entnommen)^[178]

Darüber hinaus konnte die Umsetzung von **4.7** durch Rhodesain mit Hilfe der ^{19}F -NMR-Spektroskopie verfolgt werden, da die Signalverschiebung des Fluoratoms des Esters **4.7** von der freien Säure **4.8** abweicht. Diese wurden von [REDACTED] durchgeführt und sind in der nachfolgenden Abbildung 103 dargestellt. Wie zu erkennen ist, weisen die ^{19}F -Signale der Verbindungen **4.7** und **4.8** unterschiedliche Verschiebungen auf (siehe Abbildung 103 A).

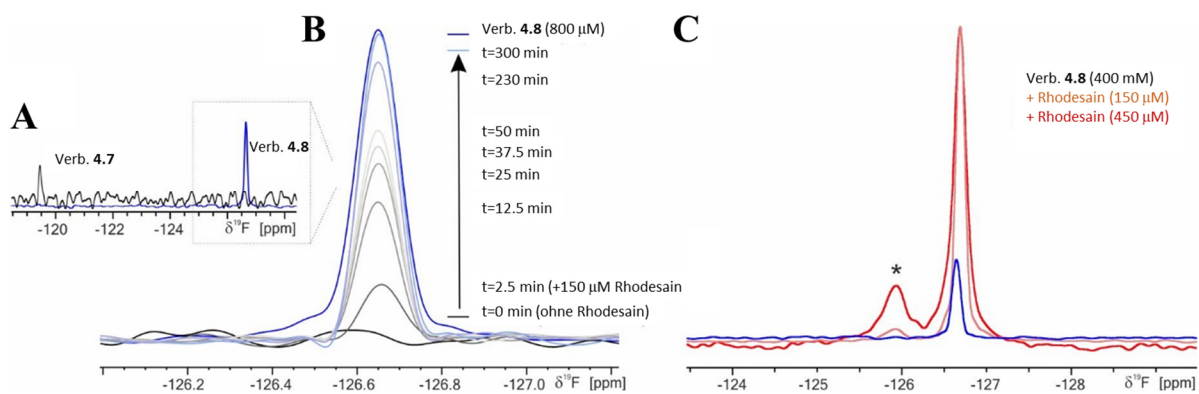


Abbildung 103: NMR-basierte Studien zur Rhodesain-katalysierten Hydrolyse von Verbindung **4.7**. (**A**) Ausschnitt aus den ^{19}F -NMR-Spektren von Verbindung **4.8** und **4.7**. Das ^{19}F -Signal der freien Säure **4.7** weist andere Verschiebung als das ^{19}F -Signal des Ester **4.7** auf. (**B**) Zeitlich aufgelöstes ^{19}F -NMR-Spektrum der Hydrolyse von **4.7** durch Rhodesain. Das Spektrum wurde zudem mit dem ^{19}F -Spektrum von Verbindung **4.8** (Blau) überlagert, wobei das Hydrolyseprodukt und die Vergleichssubstanz **4.8** dieselbe Verschiebung aufweisen. (**C**) ^{19}F -NMR-Spektrum einer Titration der Verbindung **4.8** mit Rhodesain. Es ist zu erkennen, dass Verbindung **4.8** einen Komplex mit Rhodesain formt (*) dessen Intensität von der Enzymkonzentration abhängt. Das Referenzspektrum der Verbindung **4.8** ist in Blau dargestellt. (Diese Abbildung wurde aus Molecules **2020**, *25*, 1–23 entnommen).^[178]

Zudem nahm das Signal der Säure **4.8** während der Inkubation des Esters **4.7** mit Rhodesain im zeitlichen Verlauf deutlich zu (siehe Abbildung 103 B). Darüber hinaus konnte die Ausbildung eines Rhodesain-Inhibitor-Komplexes mit der freien Säure beobachtet werden (siehe Abbildung 103 C). Dieser zeigte sich durch das Erscheinen eines weiteren, hochfeldverschobenen Signals, welches in Abhängigkeit zur Rhodesain-Konzentration steht.

Des Weiteren wurden Inhibitionsstudien mit der freien Säure **4.8** im fluoreszenzbasierten Enzymassay durchgeführt. Die dabei erhaltenen K_i -Werte betragen $3.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$ für hCathL, $1.50 \pm 0.29 \mu\text{M}$ für hCathB und $4.0 \pm 1.3 \text{ nM}$ für Rhodesain, woraus hervorgeht, dass durch die Hydrolyse des Esters die Affinität zu humanen Cathepsinen nahezu gleich blieb, während sich die zur parasitären Rhodesain um den Faktor 5,000 erhöhte.

Tabelle 29: Vergleich der Inhibitionskonstanten K_i des Esters **4.7** und der Säure **4.8** an unterschiedlichen Proteasen der CathL-Familie.

Protease	K_i (Verb. 4.7) [nM]	K_i (Verb. 4.8) [nM]
hCathL	1,600	3000 ± 900
hCathB	4,400	$1,500 \pm 290$
Rhodesain	45% Inhibition bei $20 \mu\text{M}$	4.0 ± 1.3

Da die Resultate der Protein-Massen auf keinen Verlust einer Abgangsgruppe hindeuten und in der ^{19}F -NMR-Spektroskopie kein Signal eines freien Fluorids detektiert wurde, kann angenommen werden, dass es während der Bindung des Inhibitors an Rhodesain zu keiner Substitution des aromatischen Fluoratoms oder anderer Gruppen kommt.

Da es somit auch zu keiner Bildung einer kovalenten Enzym-Inhibitor-Bindung kam, wurde vermutet, dass die Rhodesain-Inhibition reversibel sein müsste. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden Verdünnungsassays durchgeführt. Dazu wurde Rhodesain mit der Verbindung **4.8** mit einer 100fachen IC_{50} -Konzentration inkubiert. Bei Zugabe von Substrat zeigte sich, dass das Enzym vollständig inhibiert wurde (siehe Abbildung 104 A). Im Anschluss daran wurde das Rhodesain-Inhibitor Gemisch verdünnt und erneut mit Substrat versetzt, wobei die Verdünnung zu einer Rückgewinnung der enzymatischen Aktivität führte (siehe Abbildung 104 B). Dieser Rückgewinn an katalytischer Aktivität verlief zeitabhängig, wobei der Fluoreszenzanstieg stetig zunahm. Ein solcher Effekt kann bei Inhibitoren beobachtet werden, welche eine besonders lange Verweildauer am Enzym aufweisen.

Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass es sich bei Verbindung **4.8** um einen reversiblen Inhibitor handelt, welcher aufgrund der langsamen Aktivitätszunahme in den Verdünnungsexperimenten als *tight binder* bezeichnet werden kann.

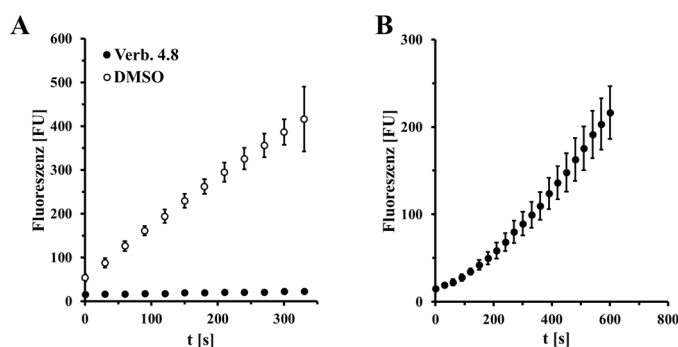


Abbildung 104: Fluoreszenzbasierte Enzymassays der Verbindung **4.8**. (A) Rhodesain wurde durch die Zugabe eines Überschusses an Verbindung **4.8** vollständig inhibiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz verwendet, in welchem reines DMSO eingesetzt wurde. (B) Eine hundertfache Verdünnung des Rhodesain-Inhibitor-Gemisches führt zu einer Rückgewinnung katalytischer Aktivität. (Diese Abbildung wurde aus *Molecules* **2020**, *25*, 1–23 entnommen).^[178]

Insgesamt stehen die experimentellen Daten im Einklang mit Ergebnissen, welche aus computergestützten Methoden gewonnen wurden. In Docking-, MD-, und QM/MM-Berechnungen wurden von [REDACTED]

[REDACTED] die WW zwischen Rhodesain und den Verbindungen **4.7** und **4.8** simuliert.

Dabei zeigte das Docking, dass die freie Säure eine dem Ester entgegengesetzte Orientierung in der aktiven Tasche des Enzyms bevorzugt. Die Estergruppe der Verbindung **4.7** lag in ihrer Pose in ausreichender Nähe zum katalytischen Cystein 131, um einen nukleophilen Angriff und damit eine Esterhydrolyse zu ermöglichen.

Durch die Umorientierung, welche durch das Docking für die Säure **4.8** postuliert wurde, kommt es zwar zu einer Annäherung des Aromaten an das katalytische Cystein, dennoch befinden sich die C-Atome des Rings in zu großer Distanz für einen nukleophilen Angriff.

Die Docking-Ergebnisse wurden durch MD-Simulationen untermauert, in welchen als Startstrukturen die Top-Docking-Pose des Esters **4.7** gewählt wurde. Die Simulationen wurden sowohl für den Ester als auch für die freie Säure durchgeführt und die Distanz zwischen dem aktiven Cystein-Rest und dem Carbonyl-C-Atom des Esters bzw. der Säure über den Verlauf der Simulation verfolgt. Dabei blieb die Distanz im Falle des Esters relativ konstant und der Inhibitor verweilte über die gesamte Simulationszeit im Enzym. Im Gegensatz dazu, kam es bei der Säure zu einer schnellen Dissoziation des Inhibitors.

Wurde als Startstruktur der Säure jedoch die umgekehrte Positionierung vorgegeben, bildete sich ein starker Enzym-Inhibitor-Komplex, in welchem das aktive Cystein mit dem Anilin-Stickstoff der Verbindung **4.8** wechselwirkte. Zuletzt wurden von [REDACTED] QM/MM-Berechnungen durchgeführt, in denen sich zeigte, dass eine S_NAr -Reaktion mit einem Meisenheimer-Komplex für ein freies Thiolat wahrscheinlich ist. In Anwesenheit des Thiolat/Imidazolium-Ionenpaars der katalytischen Triade kommt es dagegen zur Ausbildung eines stabilen π -Komplexes, welcher einen nukleophilen Angriff verhindert.

Zusammengefasst stehen die Ergebnisse der computergestützten Methoden in Einklang mit den experimentellen Beobachtungen:

- Der Ester bevorzugt eine Orientierung, welche eine Hydrolyse des Benzylesters ermöglichen würde.
- Die freie Säure bevorzugt eine umgekehrte Orientierung in der aktiven Tasche, in welcher sich ein stabiler π -Komplex zwischen dem Aromaten des Inhibitors und dem Thiolat/Imidazolium-Paar der katalytischen Triade ausbildet.
- Durch diesen π -Komplex wird die Säure in der aktiven Tasche wesentlich stärker stabilisiert als der Ester, der diesen Komplex aufgrund seiner umgekehrten Orientierung in der aktiven Tasche nicht ausbildet. Dadurch erklärt sich die stärkere inhibitorische Wirkung von Verb. **4.8** gegenüber Verb. **4.7**.
- Die Ausbildung eines Meisenheimer-Komplexes im Enzym ist energetisch ungünstig, weshalb es zu keiner Substitution am Aromaten und damit nicht zu einer irreversiblen Inhibition kommt.

Zuletzt wurde die antitrypanosomale Wirkung des Esters und der Säure in Zell-basierten Assays getestet. Diese Versuche wurden von [REDACTED] durchgeführt. Daraus resultierte ein EC_{50} -Wert von $0.095 \pm 0.04 \mu\text{M}$ für Verb. **4.7** und $18.5 \pm 4.97 \mu\text{M}$ für **4.8**, woraus sich eine stärkere trypanozide Wirkung des Esters gegenüber der Säure ergibt. Obwohl diese Werte zunächst im Widerspruch zu den Resultaten des Enzymassays zu stehen scheinen, lässt sich diese Beobachtung durch die höhere Lipophilie des Esters erklären, was zu einer erhöhten Permeabilität durch die Zellmembran führt.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Zentrales Thema dieser Dissertation ist die trypanosomale Cysteinprotease Rhodesain, die Hauptprotease von *T. b. rhodesiense*, dem Erreger der ostafrikanischen Schlafkrankheit. Dieses Enzym ist durch seine Beteiligung an einer Vielzahl humanpathogener Mechanismen, wie der Umgehung des menschlichen Immunsystems, essenziell für das Überleben der Parasiten. Dies macht Rhodesain zu einem attraktiven *target* zur Behandlung der Schlafkrankheit. Die Motivation dieser Dissertation bestand daher darin, dass ein besseres Verständnis der Protease selbst und deren Wechselwirkungen mit Inhibitoren die Basis für die Entwicklung neuer Therapieansätze bilden könnte.

Studien zur Struktur und zum Autoaktivierungsmechanismus von Rhodesain

Im Zuge der biochemischen Charakterisierung von Rhodesain wurde ein besonderer Schwerpunkt auf den Reifungsprozess der Protease gelegt, da dieser ein entscheidender Schritt in der Biosynthese von katalytisch aktivem Enzym ist. Im Wesentlichen besteht dieser Prozess aus dem Abspalten der N-terminalen Pro-Domäne des Pro-Rhodesains.

Dabei wurde die Untersuchung der molekularen Trigger des Autoaktivierungsprozesses durch eine Kristallstruktur von Pro-Rhodesain ermöglicht. Diese wurde im Verlauf dieser Dissertation erstmals erfolgreich bei einer Auflösung von 2.8 Å röntgenkristallographisch gelöst und stellt somit auch die erste Struktur eines trypanosomalen Zymogens der Cathepsin-L-ähnlichen Proteasen dar.

Obwohl Pro-Rhodesain große strukturelle Ähnlichkeit zu anderen CathL-Zymogenen aufweist, zeigt sich eine Besonderheit im Bereich des trypanosomalen *blocking peptide*, das inhibierend über dem katalytischen Zentrum liegt. Das *blocking peptide* ist im Pro-Rhodesain α -helikal (H4), wohingegen es in Pro-Cathepsinen anderer Organismen unstrukturiert vorliegt. Da die Sequenz dieses Peptids trypanosomenspezifisch ist, liegt die Vermutung nahe, dass diese zusätzliche Helix auch in anderen trypanosomalen Cathepsin L-Zymogenen vorhanden ist.

In weiteren Untersuchungen wurden auf Basis der Pro-Rhodesain-Kristallstruktur MD-Simulationen durchgeführt, bei welchen die pH-abhängigen Interaktionen der Aminosäureseitenketten ^{Pro}Arg95 und ^{Pro}Arg97 mit Asp175 und Asp223 als potenzielle Trigger der Autoaktivierung identifiziert wurden. In Mutationsstudien zeigte sich, dass der Verlust dieser polaren WW durch eine D175N-D223N-Mutation zu einer beschleunigten Aktivierung der Mutante unter basischen Bedingungen im Vergleich zum WT führte. Allerdings hatte das Einführen der Doppelmutation nur geringen Einfluss auf einen pH-abhängigen *trans-cleavage*-Prozess. Dies ging aus Gel-*shift*-Assays hervor, bei denen die Umsetzung von inaktiven Pro-Rhodesain-Mutanten durch aktives WT-Rhodesain untersucht wurde. Hierbei zeigte sich keine beschleunigte Umsetzung durch die Einführung der D175N-D223N-Mutation.

Dies deutet darauf hin, dass neben dem *trans-cleavage* noch ein weiterer Prozess an der Autoaktivierung von Pro-Rhodesain beteiligt ist.

Für diesen zusätzlichen Prozess wäre zum einen ein *cis-cleavage* denkbar, bei dem die Pro-Domäne intramolekular hydrolysiert wird. Dazu müsste sich eine Hydrolysestelle in räumlicher Nähe zum katalytischen Cystein befinden. Obwohl in LC-MS-Studien das trypanosomale *blocking peptide* als Substrat von Rhodesain identifiziert wurde, sprechen die Distanzen zwischen den Hydrolysestellen und dem katalytischen Cystein in der Kristallstruktur gegen einen *cis-cleavage*. Allerdings wurde bei diesem Experiment nur H4 und damit nur ein Teil der Pro-Domäne untersucht, der sich in der Kristallstruktur in der Nähe des katalytischen Zentrums befindet. Daher ist es möglich, dass noch weitere Spaltstellen in der Pro-Domäne existieren, die in dieser Studie nicht erfasst wurden.

Alternativ zum *cis-cleavage*-Prozess ist auch eine Freisetzung des aktiven Zentrums durch eine Konformationsänderung der Pro-Domäne denkbar. Obwohl eine starke strukturelle Änderung durch ein Sinken des pH-Werts nicht beobachtet wurde, wurde in PET-FCS-Messungen eine Dynamikänderung der Pro-Domäne und ein vergrößerter hydrodynamischer Radius des Pro-Rhodesains unter aziden Bedingungen detektiert. Obwohl ein vollständiges Aufklappen oder Entfalten der Pro-Domäne ausgeschlossen wurde, könnten dennoch geringfügige Konformationsänderungen existieren, die zu einer Freilegung des aktiven Zentrums führen.

Um die Frage nach dem unbekanntem Mechanismus eindeutig zu klären, wäre es daher hilfreich zunächst alle Hydrolysestellen innerhalb der Pro-Domäne zu identifizieren. Ein möglicher Ansatz hierzu wäre die massenspektrometrische Untersuchung der Hydrolyseprodukte der Autoaktivierung. Alternativ dazu könnte auch die isolierte Volllänge-Pro-Domäne nach Verdau durch Rhodesain verwendet werden. Die Identifikation dieser Schnittstellen würde es ermöglichen, sie gezielt aus dem Konstrukt zu entfernen, wodurch es eventuell möglich wäre, die einzelnen Aktivierungsprozesse isoliert zu analysieren.

Eine Kombination aus *cis*- und *trans-cleavage* würde dabei im Einklang mit einer aktuellen Studie stehen, in welcher die Beteiligung beider Prozesse an der Autoaktivierung von Rhodesain durch *in vivo*-Studien postuliert wurde.^[148]

Neben der Frage nach dem Mechanismus der Autoaktivierung bleibt weiterhin offen, welche der identifizierten pH-abhängigen Wechselwirkungen (^{Pro}Arg95—Asp175, ^{Pro}Arg95—Asp223, ^{Pro}Arg97—Asp175, ^{Pro}Arg97—Asp223) letztlich die entscheidenden Kontrollstellen der Aktivierung sind. Dies könnte durch die Einführung von Einzelmutationen überprüft werden. Obwohl in den Kristallstrukturen anderer CathL-Zymogene ebenfalls polare Interaktionen an vergleichbaren Stellen vorhanden sind, wurde diese Wechselwirkung in Studien zu CathL-Aktivierungsmechanismen bislang nicht untersucht. Stattdessen wurde sich hauptsächlich auf Wechselwirkungen innerhalb des N-terminalen Bereichs des Propeptids fokussiert.^{[85][87]} Somit könnte der C-terminale Bereich des *blocking peptide* ein weiteres Motiv darstellen, über welches die pH-sensitive Autoaktivierung von CathL-Zymogenen reguliert wird.

Zuletzt wurde innerhalb des Propeptids die Wechselwirkung zwischen den Seitenketten der Aminosäuren ^{Pro}Arg83 und ^{Pro}Glu76 als potenzielle pH-sensitiver Trigger identifiziert, da diese Interaktion in MD-Simulationen nur unter basischen Bedingungen beobachtet wurde. Der Einfluss, den diese Interaktion auf die Autoaktivierung des Pro-Rhodesains hat, könnte analog zu den Versuchen mit der D175N-D223N-Doppelmutation durch die Einführung einer E76Q-Mutation in aktives Rhodesain oder inaktives Rhodesain-C131A überprüft werden.

Thermodynamische und kinetische Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen Rhodesain und Vinylsulfon-basierten Inhibitoren

Neben den Studien zum Reifungsprozess von Pro-Rhodesain, wurde in dieser Arbeit die Bindung Vinylsulfon-basierter Cysteinprotease-Inhibitoren an Rhodesain untersucht. Diese Bindung wurde sowohl hinsichtlich ihrer Thermodynamik als auch ihrer Kinetik charakterisiert.

Durch ITC-Messungen wurde dabei erstmals das thermodynamische Profil der Rhodesain-(α -Fluoro-)Vinylsulfon-Interaktion aufgeschlüsselt. Aus diesen Messungen ging hervor, dass sowohl die Bindungen der Vinylsulfone als auch ihrer α -Fluoro-Derivate an Rhodesain stark Enthalpie-getrieben verläuft. Zudem zeigte sich, dass die Reaktion der Vinylsulfone deutlich exergoner verläuft als die ihrer α -Fluoro-Gegenstücke. Obwohl fraglich bleibt, in wie weit die Messung der irreversiblen Vinylsulfon-Liganden aufgrund nicht vorhandener K_D -Werte auswertbar sind, steht diese Beobachtung in Übereinstimmung mit den unter 1.7 beschriebenen Energieprofilen reversibler und irreversibler Liganden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es während der Rhodesain-VS-Bindung zu keiner Protonenübertragung zwischen Ligand bzw. Enzym und Puffer kommt. Daher sind die gemessenen ΔH -Signale direkt auf die Ausbildung der Enzym-Inhibitor-Bindung zurückzuführen und können als unabhängig von der Ionisierungsenthalpie des Puffers angesehen werden.

Aus den erhaltenen ITC-Daten wurden zudem kinetische Informationen ermittelt. Die erhaltenen k_{on} - und k_{off} -Werte waren vergleichbar mit den Resultaten aus anderen Messmethoden wie iSPR oder *rapid-mixing*-Experimenten. Die Abweichungen in den kinetischen Konstanten können auf Unterschiede in den Messmethoden sowie strukturelle Unterschiede der Inhibitoren selbst zurückgeführt werden.

Obwohl die Löslichkeit der Inhibitoren ein stark limitierender Faktor ist und deshalb kein großer Durchsatz an Liganden gemessen werden konnte, wurde durch das ITC-Protokoll eine Methode etabliert, die es ermöglicht gleichzeitig thermodynamische und kinetische Informationen aus einer einzelnen Messung zu erhalten. Somit könnte diese Methode zukünftig zur Charakterisierung und Optimierung von Rhodesain-Inhibitoren und neuartiger *warheads* genutzt werden.

Als alternatives Messverfahren zur Bestimmung kinetischer Konstanten wurde die *rapid-mixing*-Methode verwendet. In diesen Experimenten werden im Vergleich zu ITC-Messungen nur geringe Inhibitor-Konzentrationen benötigt, wodurch es zu keiner Limitierung durch die Löslichkeit der Liganden kommt. Zudem erfordert diese Methode keine Immobilisation des Proteins oder des Liganden wie beim SPR-Experiment. Da die Freiheitsgrade der Reaktionspartner somit nicht eingeschränkt werden, wird ein natürliches System besser imitiert als bei SPR-Experimenten. Die *rapid-mixing*-Methode mit der Rhodesain-Q127W-Mutante könnte damit zukünftig zur Charakterisierung eines breiteren Spektrums an Rhodesain-Inhibitoren verwendet werden.

Die Grundlage für diese neuartige Messmethode wurde durch das Design der Rhodesain-Q127W-Mutante geschaffen, deren zusätzliches Tryptophan zu einer Löschung der Fluoreszenz gebundener Atto-markierter Inhibitoren führt. Die Identifikation dieser Mutante wurde durch das Protokoll zur heterologen Expression von Rhodesain in *E. coli* ermöglicht, das ebenfalls als Teil dieser Arbeit entwickelt wurde.

Zusätzlich wurden erste vielversprechende Vorversuche von MST- oder SPR-Experimenten unternommen, wofür eine Strategie zur Markierung von Rhodesain mit kleinen Molekülen etabliert wurde. Durch dieses Protokoll kann Pro-Rhodesain-S279C an der Seitenkette des artifiziellen Cysteins innerhalb der katalytischen Domäne markiert werden, ohne dass es zur Inaktivierung der Protease kommt.

In den ersten MST- oder SPR-Experimenten ließen sich keine Bindungsparameter aufgrund mangelnder Sensitivität der Methoden bestimmen. Diese Sensitivität könnte durch Optimierung der Messbedingungen wie z. B. durch Austausch des SPR-Chips oder des Rhodesain-Konjugats gesteigert werden. Durch eine verbesserte Sensitivität könnten anschließend die kinetischen Parameter der Bindung zwischen Rhodesain und einer Vielzahl unterschiedlicher Inhibitoren im hohen Durchsatz analysiert werden.

Darstellung eines RNA-Vinylsulfon-Konjugates zur spezifischen Adressierung von *Trypanosoma brucei*

Im Rahmen dieses Projektes wurde der Ansatz eines Vinylsulfon-RNA-Biokonjugates als *drug delivery*-System zur gezielten Adressierung von *T. brucei*-Zellen verfolgt. Die Kopplung der Inhibitoren sollte an ein Derivat des publizierten Aptamers 2-16 geschehen, da sich dieses spezifisch an ein Oberflächenprotein innerhalb der flagellaren Tasche von *T. b. brucei* bindet, wodurch es in dessen Lysosom endozytiert wird, in welchem sich das *target* Rhodesain befindet.^[141]

Zur Etablierung der Reaktionsbedingungen für die Konjugation von Aminen an RNA wurde ein Fluorescein-Derivat und unterschiedliche Vinylsulfone an Modell-RNAs gekoppelt. Dies wurde durch

selektive Oxidation des 3'-Terminus der RNA *via* Malaprade-Reaktion und anschließender reduktiver Aminierung erreicht. Die Konjugationsprodukte wurden erfolgreich mittels LC-MS verifiziert und isoliert.

Eines der VS-RNA-Konjugate wurde nach Isolierung im fluoreszenzbasierten Enzymassay auf dessen inhibitorische Wirkung gegen Rhodococcus untersucht. Obwohl die Wirkung des Kopplungsprodukts schwächer war als die des freien Inhibitors, war dennoch eine Inhibition zu beobachten. Dieses Resultat wurde auf eine sterische Hinderung durch die RNA zurückgeführt, die zu einer Verlangsamung der Assoziationsreaktion geführt haben könnte. Somit stellen die Vinylsulfon-RNA-Konjugate einen vielversprechenden Ansatz für ein *drug delivery*-System dar.

Zudem konnten sowohl ein Derivat des Aptamers 2-16 als auch dessen serumstabile 2'-F-2'-Desoxy-Uridin/Cytidin-modifizierte Variante synthetisiert werden. Die Herstellung der RNA erfolgte mittels *run-off in vitro transcription (IVT)* mit T7-RNA-Polymerase, wobei der Einbau der modifizierten Nukleotide durch eine Y639F-Mutation der Polymerase ermöglicht wurde.

Das Syntheseprodukt der IVT wurde durch RNase T1 in definierte Fragmente hydrolysiert und diese mittels LC-MS untersucht. Obwohl in dieser Methode nicht alle Fragmente des Verdauens detektiert wurden, konnten größere Abschnitte (≥ 4 Basen) identifiziert werden. Da zu diesen Fragmenten der 3'-Terminus der RNA zählt, kann angenommen werden, dass die Transkription der RNA vollständig verlief.

Die Übertragung des Kopplungs- und Aufreinigungsprotokolls der Modell-RNA auf das Aptamer 2-16 Derivat waren jedoch bislang nicht erfolgreich. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass während der Aufreinigung des IVT-Produktes größere Mengen an rNTPs verschleppt wurden, welche eine Konkurrenzreaktion mit dem Inhibitor eingehen könnten. Dies ließe sich durch einen optimierten Aufreinigungsprozess der IVT beheben. Mögliche Ansätze wären dabei eine Gelextraktion oder eine mehrstufige Aufreinigung mittels Chloroform/Phenol-Extraktion, AEX und anschließender SEC.

Nach erfolgreicher Kopplung wäre der nächste Schritt eine Testung in einem Zell-basierten Assay, um die trypanozide Wirkung und die Toxizität gegenüber humanen Zellen mit denen des freien Inhibitors zu vergleichen.

Für die weitere Planung des Projekts wäre zudem ein Ansatz denkbar, in welchem 2'-F-2'-Desoxy-UTP teilweise durch 5-Ethynyl-Uracil in der RNA substituiert wird. Diese Strategie würde es ermöglichen, die RNA unter schonenderen Bedingungen mit dem Inhibitor in einer Click-Reaktion mit Aziden zu konjugieren. Zudem könnte die Effizienz des Konjugats durch die Anwesenheit mehrerer Inhibitormoleküle pro Makromolekül deutlich gesteigert werden.

Ein möglicher Nachteil dieser Strategie ist jedoch, dass der Einbau dieser Nukleotide zu einer Störung der Tertiärstruktur der RNA führen könnte. Daher müsste zunächst getestet werden, zu welchem Anteil der Einbau dieser Nukleotide toleriert wird. Des Weiteren würde ein statistischer Einbau der Ethynyl-

Nukleotide zu einem heterogenen Gemisch führen, was die Analyse der IVT-Produkte deutlich erschweren würde.

Ein weiterer Ansatz ist der Einbau einer säurelabilen Einheit zwischen Inhibitor und RNA. Durch den Aufbau eines solchen Konstruktes könnte das RNA-Aptamer den Inhibitor nach Endozytose im sauren Milieu des Trypanosomen-Lysosoms gezielt freisetzen. Zudem könnten ähnliche Aptamere auch zur Adressierung von Tumorgeweben genutzt werden, welche ebenfalls für ihre saure Umgebung bekannt sind. Zielenzyme eines solchen Ansatzes wären die humanen Cathepsine, da diese in Tumorzellen überexprimiert werden.^[179]

8 Material und Methoden

8.1 Grundlagen der PET-FCS-Experimente

Die *photoinduced electron transfer-fluorescence correlation spectroscopy* (**PET-FCS**) ist eine Methode, welche Anwendung in der Aufklärung dynamischer Konformationsänderungen von Biomolekülen findet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Kombination zweier unterschiedlicher Messverfahren, dem PET und dem FCS.^{[166][167]}

Ersteres beschreibt die Löschung der Fluoreszenz, die bei Kontakt eines Farbstoffs mit einem passenden Löschmolekül (*Quencher*) auftreten kann. Ein energetisches Schema des PET ist in der nachfolgenden Abbildung 105 A angegeben. Dabei kommt es zunächst zu einer elektronischen Anregung des Farbstoffs, für welchen zwei Möglichkeiten bestehen, in seinen Grundzustand zurückzukehren und die Anregungsenergie wieder abzugeben:

- 1) Durch die Emission von Licht. Dieser Prozess ist als Fluoreszenz bekannt.
- 2) Durch den strahlungslosen *photoinduced electron transfer*, welcher in die Teilschritte einer Ladungstrennung und -rekombination (*charge separation* und *recombination*) aufgetrennt werden kann.

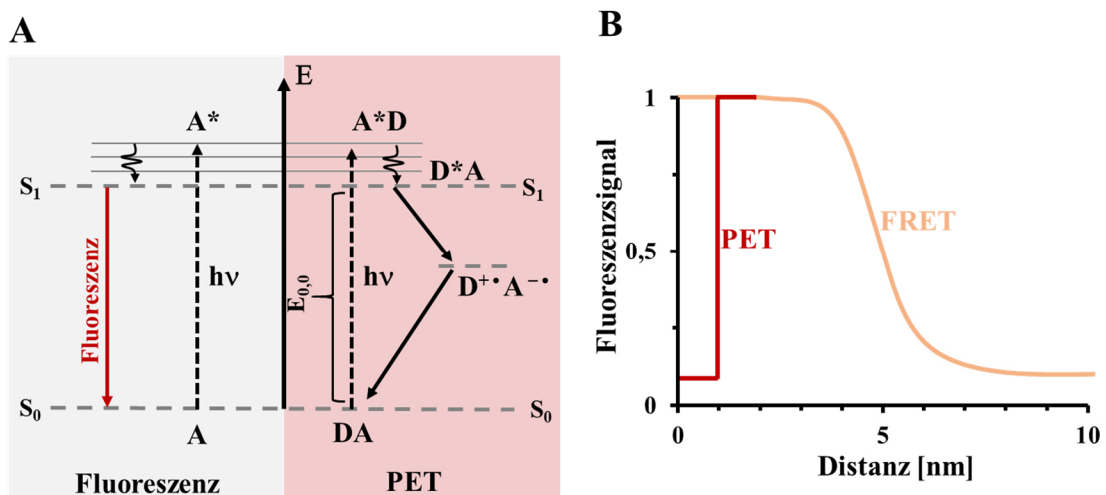


Abbildung 105: (A) Vereinfachtes Energieschema eines Fluoreszenz- und eines PET-Prozesses. Ein Fluoreszenzfarbstoff A wird durch Lichtabsorption auf ein höheres Energieniveau (S_1) angehoben und sinkt in einem strahlungslosen Übergang auf einen niedrigeren Schwingungszustand. In Abwesenheit eines Elektronendonors (D) kehrt der Farbstoff durch Lichtemission auf sein Grundniveau zurück (Fluoreszenz). In Kontakt mit einem passenden Elektronendonor kann es ausgehend vom Zustand (S_1) zur Elektronenübertragung kommen, wodurch ein radikalisches Ionenpaar (D^+A^-) entsteht. Dieses sinkt durch Rekombination auf seinen Grundzustand zurück (DA). (B) Abstandsabhängigkeit der gemessenen Fluoreszenz in einem FRET- (orange) und einem PET-System (rot).^[4]

Für diesen zweiten PET-basierten Prozess müssen jedoch zwei Bedingungen erfüllt sein. Zum einen müssen das Reduktionspotenzial des Elektronenakzeptors (A) bzw. des Farbstoffs und das Oxidationspotenzial des Donors (D) passend zueinander sein, damit ein Elektronentransfer spontan ablaufen kann und es zu einer Ladungstrennung durch die Bildung eines radikalischen Ionenpaars kommt. Dies ergibt sich aus der Gleichung (6):

$$\Delta G_{CS} = E_{ox} - E_{red} - E_{0,0} + C \quad (6)$$

wobei ΔG_{CS} der freien Energie der Ladungstrennung entspricht und E_{ox} / E_{red} das erste Oxidationspotenzial des Donors bzw. das erste Reduktionspotenzial des Akzeptors für eine Ein-Elektronen-Übertragung darstellen. $E_{0,0}$ entspricht dabei der Energie eines Übergangs vom null-null-Grundzustand zum ersten angeregten Singulett-Zustand und C der lösungsmittelabhängigen coulombschen WW.^[180] In Kombination mit einem Oxazingerüst-basierten Farbstoff (wie Atto655 oder ATTO Oxa11) wird diese Voraussetzung in Biopolymeren nur von einer natürlichen Aminosäure, Tryptophan, und einer Nukleobase, Guanin, erfüllt.^{[181][182]}

Zum anderen müssen sich Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe befinden, damit durch einen Van-der-Waals-Kontakt der π -Orbitale eine Elektronenübertragung ermöglicht wird.^{[166][167]}

Im Vergleich zu dem bekannteren System der *fluorescence resonance energy transfer*-Messungen (FRET) führt dies zu einigen Unterschieden. Die Anregungsenergie kann in FRET-Systemen strahlungslos durch Dipol-Dipol-WW vom Donor- auf das Akzeptormolekül und somit über eine längere Distanz übertragen werden. Da für einen Elektronentransfer ein geringer Abstand in der Kontaktgeometrie nötig ist, ist das Auftreten eines PET-Effekts auf eine Distanz von ≤ 1 nm beschränkt, während das Signal einer typischen FRET-Messung selbst in einem Abstand von ~ 5 nm, abhängig von den photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe, noch zu 50% gelöscht wird. Durch diese kurzreichweitige Distanzabhängigkeit kann das PET-System als ein molekularer *on-/off*-Schalter betrachtet werden, in welchem es nur dann zu einer Fluoreszenzlöschung kommt, wenn sich die untersuchten Molekülbereiche in räumlicher Nähe befinden.^[183]

Zudem besitzt das PET-System den Vorteil, dass eine Einfachmarkierung des Biomoleküls mit einem Farbstoff bereits ausreichend sein kann, da natürlich vorkommende Löschmoleküle wie Tryptophan oder Guanin für die Ausbildung eines *Dye-Quencher*-Paars genutzt werden können. Hingegen sind für FRET-Messungen aufwändigere Zweifachmarkierungen mit unterschiedlichen Farbstoffen notwendig, wodurch die Eigenschaften des Biomoleküls stärker beeinflusst werden. Zudem kann die Abwesenheit eines Tryptophans oder eines Guanins durch einfache Mutagenese kompensiert werden.^[184]

FCS-Messungen können dazu genutzt werden die Zeitkonstanten zu ermitteln, auf welcher molekulare Ereignisse stattfinden. Während der Messung einer fluoreszierenden Probe innerhalb eines Fokus kommt es zu Fluoreszenzfluktuationen. Das zeitliche Verhalten der stochastischen Fluktuation der

Fluoreszenzintensität wird in der FCS analysiert, um eine zeitabhängige Autokorrelation zu berechnen. Diese ergibt sich aus der Gleichung (7)

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (7)$$

wobei $\delta F(t)$ die Fluktuation des Fluoreszenzsignals darstellt und sich nach Gleichung (8)

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (8)$$

aus der Differenz des Fluoreszenzsignals $F(t)$ zum Zeitpunkt t und dem zeitlich gemittelten Wert $\langle F(t) \rangle$ ergibt.^[185] Vereinfacht ausgedrückt kann die Autokorrelation $G(\tau)$ als die (Selbst-)Ähnlichkeit des Signals einer Probe nach einer Verzögerungszeit (*lag time*, τ) angesehen werden. Da der Wechsel eines kleinen Ensembles fluoreszierender Moleküle innerhalb des Fokus zu einem Sinken der Autokorrelation führt, können somit Aussagen über Dynamiken der Proben getroffen werden. Durch das Auftragen der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ gegen die Zeit wird in klassischen FCS-Experimenten ein Kurvenverlauf erhalten, dessen Abfallen die Diffusion des Moleküls aus dem Fokus charakterisiert (Abbildung 106 A). Der zeitliche Rahmen, zu dem dieses Ereignis stattfindet, ist somit abhängig von der Diffusionsgeschwindigkeit des Moleküls, die wiederum vom hydrodynamischen Radius, der Temperatur und Lösemittelviskosität abhängig ist.^[186]

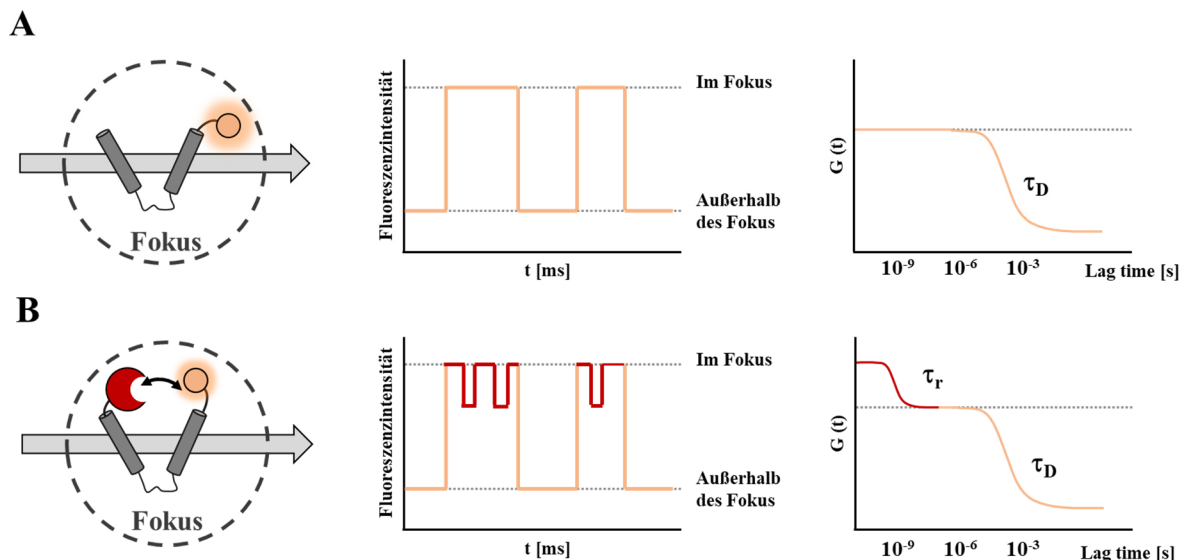


Abbildung 106: Vereinfachte schematische Darstellungen der (PET-)FCS-Messungen. (A) Klassische FCS-Messung, in der kein PET-Prozess stattfindet. Ein kleines Ensemble konstant fluoreszierender Moleküle diffundiert durch den Fokus und erzeugt beim Durchtritt ein Abfallen der Autokorrelation $G(\tau)$ mit einer charakteristischen Zeitkonstante τ_D . (B) Durch eine dynamische Konformationsänderung, dessen Kinetik schneller als das Diffundieren durch den Fokus verläuft, kommt es zeitweise zu einem Löschen der Fluoreszenz, welche sich als zusätzliches Abfallen der autocorrelation function (ACF) bemerkbar macht. Die Zeitkonstante τ_r entspricht dabei der Geschwindigkeitskonstante, mit der diese Konformationsänderung verläuft.^[187]

In Kombination mit PET kann jedes Ereignis, welches zu einem Löschen der Fluoreszenz führt, als zusätzliches Abfallen der Autokorrelation beobachtet und somit einer Zeitkonstante zugeordnet werden. Somit ist es durch PET-FCS beispielsweise möglich, Dynamiken innerhalb eines Biomoleküls zu beobachten und Aussagen darüber zu treffen, wie schnell diese ablaufen. Ein solcher Prozess muss jedoch deutlich schneller als eine Diffusion des Moleküls aus dem Fokus ablaufen. Zudem besteht eine weitere Einschränkung durch die begrenzte Fluoreszenzlebensdauer oder *fluorescence lifetime* der Farbstoffe, wodurch in der PET-FCS Prozesse detektiert werden können, welche im ns – ms Bereich stattfinden.

8.2 Verwendete Programme

Tabelle 30: Auflistung der verwendeten Programme.

Software	Version	Verwendung
SnapGene	SnapGene-viewer (5.0.5)	Darstellung der Plasmid-Karten
BLAST	NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)	<i>Sequence alignment</i>
BeStSel	BestSel Testversion (http://bestsel.elte.hu/index.php)	Berechnung von Sekundärstrukturanteilen aus CD-Spektren
ChemDraw	ChemBioDraw Ultra 13.0	Zeichnung chemischer Moleküle
Mongo Oligo Mass Calculator	Mongo Oligo Mass Calculator v.2.08 (https://mods.rna.albany.edu/masspec/Mongo-Oligo)	Berechnung von Molekulargewichten und m/z-Verhältnissen von RNA-Molekülen
GraFit	GraFit® (5.0.13, Erithacus Software)	Enzymkinetische Berechnungen
PyMol	PyMOLMolecular Graphics System, LLC Schrödinger Version 1.8, 2015	Darstellung von Proteinstrukturen
Microsoft Office	Microsoft Office 365	Erstellen von Dokumenten, Tabellen und Grafiken
MOE	MOE 2015.1001	Similaritäts- und Identitätssuche, Darstellung von Proteinstrukturen
WinCoot	WinCoot-0.8.9.2	<i>Refinement</i> der Kristallstruktur
<i>kin</i> ITC-ETC-Software	<i>kin</i> ITC-Software (www.affinimeter.com)	Untersuchung kinetischer Parameter anhand von ITC-Daten
ImageJ	ImageJ 1.52q	Bestimmung von Bandenintensitäten in SDS-PAGE-Gelen
MicroCal-Analyse-Software	MicroCal-PEAQ-ITC-Automated-Software	Auswertungen von ITC-Messungen
Protparam	ExpASy ProtParam tool https://web.expasy.org/protparam/	Berechnungen von theoretischen Proteinparametern
Clustal Omega	Multiple Sequence Alignment-Tool https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/	Peptidsequenz-Alignments

8.3 Verwendete Laborgeräte

Tabelle 31: Auflistung der verwendeten Laborgeräte.

Gerät	Hersteller (Firmensitz)
Branson Sonifier 250	<i>Branson</i> (Danbury ,USA)
Zentrifuge 5810 R	<i>Eppendorf</i> (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5415 R	<i>Eppendorf</i> (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Multifuge X3R	<i>Heraeus</i> (Hanau, Deutschland)
Avanti J-26XP Zentrifuge	<i>Beckmann Coulter</i> (Brea, USA)
Zentrifugen-Rotor JA 25.50	<i>Eppendorf</i> (Hamburg, Deutschland)
Frac-920 Fraktionssammler	<i>Bio-Rad</i> , (Hercules, Kalifornien, USA)
PowerPac <i>Basic power supply</i>	<i>Bio-Rad</i> , (Hercules, Kalifornien, USA)
Mini-PROTEAN Tetra Cell	<i>Bio-Rad</i> , (Hercules, Kalifornien, USA)
ViewPix700 Scanner	<i>GE Healthcare</i> , (Fairfield, USA)
Analysenwaage M-Power	<i>Satorius</i> (Göttingen, Deutschland)
Feinwaage BP-210 S	<i>Satorius</i> (Göttingen, Deutschland)
NanoDrop 2000c UV-Vis Spektrophotometer	<i>ThermoScientific</i> , (Waltham, Massachusetts, USA)
Thermal cycler	<i>MWG</i> (Biotech, Ebersberg)
Heizblock AccuBlock	<i>Labnet International</i>
Trinocular Stereomicroscope with 7x - 45x zoom	<i>Molecular Dimensions</i> (Maumee, Ohio, USA)
Microskop WiFi CMOS C-mount Kamera 5MP	<i>Molecular Dimensions</i> (Maumee, Ohio, USA)
Schüttelinkubator MaxQ 4000	<i>Thermo Scientific</i> (Waltham, Massachusetts, USA)
pH-Elektrode pHenomenal	<i>VWR</i> (Radnor, Pennsylvania, USA)
Direct-Q® 5 UV-Wasseraufbereitungssystem	<i>Merk</i> (Darmstadt, Deutschland)
NGC-Quest ÄKTA <i>purifier</i>	<i>Bio-Rad</i> , (Hercules, Massachusetts, USA)
ENrich™ SEC 70 column	<i>Bio-Rad</i> , (Hercules, Massachusetts, USA)

HiLoad 16/600 Superdex 75 SEC column	<i>GE Healthcare, (Fairfield, Connecticut, USA)</i>
HiLoad 16/600 Superdex 200 SEC column	<i>GE Healthcare, (Fairfield, Connecticut, USA)</i>
HisTrap™ HP 5 mL	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)</i>
HiTrap® Q HP 5 mL	<i>Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)</i>

8.4 Verwendete *E. coli*-Stämme

Tabelle 32: Auflistung der verwendeten *E. coli*-strains und deren Genotyp.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp
BL21	B F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) [malB⁺]_{K-12}(λ^S)</i>
BL21 (DE3) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)	B F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]_{K-12}(λ^S)</i>
DH5α (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)	F ⁻ φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>
Rosetta TM 2 (DE3) pLysS (Merck, Darmstadt, Deutschland)	B F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]_{K-12}(λ^S) pLysSRARE[T7p20 ileX argU thrU tyrU glyT thrT argW metT leuW proL ori_{p15A}](Cm^R)</i>
XL10-Gold [®] (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)	Tet ^r Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^rZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]</i>
ArcticExpress (DE3) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)	B F ⁻ <i>ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^R gal λ(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent^R]</i>

8.5 Biochemische Analysemethoden

8.5.1 SDS-PAGE

Für die Analyse von Rhodesain wurden 14 – 15%ige SDS-PAGE-Gele verwendet. Die Proteinproben wurden mit 25 Vol% 4x Lämmli-Puffer versetzt, 5 min auf 95 °C erhitzt und bei 180 V und 400 mA für 45 – 50 min in SDS-Laufpuffer aufgetrennt. Die Gele wurden für 45 min mit Färbereagenz angefärbt, zwei Mal für 30 min in Entfärbereagenz entfärbt und gescannt. Die verwendeten Puffer und Reagenzien der SDS-PAGE sind in der nachfolgenden Tabelle 33 angegeben.

Tabelle 33: Zusammensetzung von Puffern und Gelen der SDS-PAGE.

Puffer	Zusammensetzung
Färbereagenz	450 mL H ₂ O, 450 mL EtOH, 100 mL AcOH
Entfärbereagenz	450 mL H ₂ O, 450 mL EtOH, 100 mL AcOH
4x Lämmli-Puffer	200 mM Tris-HCl pH 6.8, 400 mM DTT, 8% SDS (w/w), 0.4% Bromphenol Blau (w/w), 40% Glycerol (v/v)
SDS-Lauf-Puffer	1% (w/w) SDS, 192 mM Glycin, 25 mM Tris
14%iges Trenngel	4.7 mL 30%iger Bis-Acrylamid/Acrylamid-Mix, 2.5 mL Trenngelpuffer, 200 µL 10%ig SDS (w/w), 2.7 mL H ₂ O, 50 µL 10%iges APS, 5 µL TEMED
Sammelgel	3.4 mL H ₂ O, 0.63 mL Sammelgelpuffer, 0.83 mL 30%iger Bis-Acrylamid/Acrylamid-Mix, 100 µL 10%ig SDS (w/w), 25 µL APS, 5 µL TEMED
Sammelgel-Puffer	1.5 mM Tris-HCl pH 8.8
Trenngel-Puffer	1 mM Tris-HCl pH 6.8

8.5.2 Western-Blot

Die Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch einen weiteren Elektrophoreseschritt (110 V, 1 – 1.5 h) in Tankblot (TB)-Puffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20% EtOH (v/v)) unter Kühlung auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Die Membran wurde zuvor durch Inkubieren in MeOH, MilliQ-H₂O und TB-Puffer für je 1 min aktiviert. Nach Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran wurde die Membran für 1 h bei RT mit Blockierlösung inkubiert und drei Mal für je 5 min mit PBS/T (2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 0.5% (v/v) Tween 20) gewaschen. Die Inkubation mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Antikörper erfolgte für 1 h bei RT oder 4 °C über Nacht. Ungebundene

Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS/T für je 5 min bei RT entfernt und die Membran umgehend mit einer 1 : 1-Mischung Roti®-Lumin-Reagenz 1 und 2 versetzt. Die entstandene Lumineszenz wurde durch eine STELLA 3200 CCD Kamera (*Raytest GmbH*, Straubenhardt, Deutschland) detektiert.

Tabelle 34: In Western-Blots verwendete Blockierlösung und Antikörper-Lösungen.

Nachweis	Blockierlösung (v/v)	Antikörper-Lösung
His-Tag	5% Milchpulver in PBS/T	Anti-His ₆ -HPR (<i>ThermoScientific</i> , Waltham, USA) 1 : 5,000 mit Milchpulver in PBS/T

8.5.3 Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten geschah durch Agarosegel-Elektrophorese in 1 – 2%igen Agarosegelen (Agarose : Laufpuffer, w/w) bei 110 V für 1.5 h. Die Detektion erfolgte nach 10 min Anfärben des Gels in GelRed-Lösung (*Biotium*, Fremont, USA) und einmaligem Waschen mit Laufpuffer bei einer Wellenlänge von 526 nm.

Tabelle 35: Zusammensetzung der Gele und Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese.

Puffer	Zusammensetzung
10x TAE-Puffer	400 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 200 mM Essigsäure
Laufpuffer	100 mL 10x TAE-Puffer, 900 mL H ₂ O
Anfärbereagenz	200 mL Laufpuffer, 100 mL 3x GelRed (<i>Biotium</i> , Fremont, USA)

8.5.4 CD-Spektroskopie

Die Aufnahme der CD-Spektren erfolgte an einem Jasco-815 CD-Spektrometer (*JASCO Deutschland GmbH*, Groß-Umstadt, Deutschland) in einem Wellenlängenbereich von 190 – 260 nm bei 5 nm Bandbreite, einem Intervall von 1 nm und einer *scanning speed* von 50 nm/min. Die Proben wurden bei 25 °C in einer 1 mm Quarzküvette gemessen, wobei eine Konzentration von 5 µM für Proteinproben und 25 µM für Peptide eingestellt wurde. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 36 aufgeführt. Die Spektren wurden aus dem Mitteln von drei Messungen und Abzug der Basislinie erhalten und die Sekundärstrukturanteile durch das Online-Tool *BeStSel* (<http://bestsel.elte.hu/index.php>) innerhalb des

Bereichs von 200 – 250 nm. Die Umrechnung der erhaltenen Elliptizitäten in die *mean residue*-Elliptizität erfolgte nach Formel (9)

$$[\theta]_{mrw,\lambda} = \frac{MRW \cdot [\theta]}{10 \cdot c \cdot d} \quad (9)$$

wobei c der Proteinkonzentration und d der Länge des Strahlengangs durch die Probe entspricht. Die *mean residue weight* (MRW) wurde durch Formel (10) berechnet.

$$MRW = \frac{M}{N - 1} \quad (10)$$

Dabei steht M für das Molekulargewicht des Proteins oder Peptids und N für die Anzahl der Aminosäuren pro Molekül.

Tabelle 36: Für CD-Spektroskopie von (Pro-)Rhodesain verwendete Puffer.

pH-Wert	Puffer
5.5	10 mM NaOAc, 3 mM NaCl
8.0	10 mM Tris, 3 mM NaCl

TFE-Titrationen

Die Messung der CD-Spektren der TFE-Titrationen erfolgte analog innerhalb des Bereichs von 190 – 250 nm. Die Proben für die Messungen bei verschiedenen TFE-Konzentrationen und unterschiedlichen pH-Werten wurden nach dem in Tabelle 37 angegebenen Pipettierschema vorbereitet.

Tabelle 37: Pipettierschema und verwendete Puffer der TFE-Titration.

Lösung	Volumen [μ L]	pH-Wert	20x Puffer
20x Peptid-Lsg. (500 μ M)	10	4.0	60 mM NaOAc, 100 mM NaCl
20x Puffer	10	8.0	60 mM Tris, 100 mM NaCl
TFE	(x = 20, 60, 120, 180)		
H ₂ O	(180 – x)		

8.6 Heterologe Proteinexpression von Rhodospirillum rubrum in *P. pastoris*

8.6.1 Gewinnung von WT-Rhodospirillum rubrum aus *P. pastoris*

Tabelle 38: Zusammensetzung der Puffer und Medien für die Proteinexpression von Rhodospirillum rubrum aus *P. pastoris*

Puffer/Medium	Zusammensetzung
2x YP	20 g Hefeextrakt, 40 g Pepton mit H ₂ O auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert
BMM	2.4 L H ₂ O (autoklaviert) 15 mL Methanol, 300 mL Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 6.0, autoklaviert), 1.5 mL 500x Biotin, 3 mL 1000x Ampicillin, 300 mL 10x YNB
10x YNB	34 g YNB (<i>without aminoacids, without ammonium sulfate, Sigma-Aldrich</i>), 100 g Ammoniumsulfat ad 1 L in H ₂ O (autoklaviert)
500x Biotin	20 mg Biotin mit H ₂ O auf 100 mL aufgefüllt
Puffer A	20 mM Natriumcitrat pH 5.0, 2 M NaCl
Puffer B	20 mM Natriumcitrat pH 5.0
2x SEC-Puffer A	40 mM Natriumcitrat pH 5.0, 400 mM NaCl
1000x Ampicillin	100 mg/mL Ampicillin in 50%igem Ethanol (v/v)

Proteinexpression aus *P. pastoris*

Rekombinante *P. pastoris* X33-Klone mit einem AOX1-Promotor-reguliertem Rhodospirillum rubrum-Gen (freundlicherweise von ██████████ zur Verfügung gestellt) wurden auf LB-Agar mit 100 µg/mL Ampicillin ausplattiert und 2 Tage bei RT inkubiert.^[146] Anschließend wurden die Zellen in 200 mL *yeast-extract peptone (YP)*-Medium überführt (100 mL 2x YP, 4 mL 50%iges Glycerol, 200 µL Ampicillin-Stammlösung, 96 mL H₂O (autoklaviert)) und für 24 h bei 30 °C inkubiert.

3 L YP-Medium wurden mit der ersten Vorkultur angeimpft und die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 2 – 3 bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 20 °C und 4,500 g für 15 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in 3 L *buffered minimal methanol (BMM)*-Medium aufgenommen und bei 25 °C inkubiert wobei alle 12 h zusätzliche 15 mL Methanol (0.5 Vol%) zugegeben wurden. Nach 72 h wurden die Zellen zunächst bei 4 °C, 4,500 g und anschließend bei 4 °C, 13,000 g für jeweils 10 min vom Medium abgetrennt. Der Überstand wurde filtriert (Celluloseacetat-Filter, 0.2 µm Porengröße, *VWR International*, Pennsylvania, USA) und bei 4 °C gelagert. Die Zusammensetzungen der einzelnen Medien, Puffer und Lösungen sind in Tabelle 38 angegeben.

Reinigung von Rhodensain aus *P. pastoris* Expressionsmedium

Reinigung und Aufkonzentration von Rhodensain aus dem Expressionsmedium erfolgte durch eine *hydrophobic interaction chromatography (HIC)*. Dazu wurde eine HIC-Säule (~20 mL Phenylsepharose Fast Flow, *GE Healthcare*, Fairfield, USA) mit Puffer A vorinkubiert und 1.2 L Medium mit 0.8 L 5 M NaCl-Lösung versetzt. Das Medium wurde mit 5 mL/min auf die Säule aufgetragen und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde mit 40 mL Puffer A und einem Gradienten (0% Puffer B – 100% Puffer B, 35 min) bei 2 mL/min gespült. Das Protein konnte durch MilliQ-H₂O eluiert werden, wobei die Elutionsfraktionen anschließend 1 : 1 (v : v) mit 2x SEC-Puffer versetzt wurden. Die finale Aufreinigung erfolgte durch eine *size exclusion chromatography (SEC)*. Dazu wurden die Elutionsfraktionen bei 4 °C und 5,000 g mit Zentrifugationsfiltern (Vivaspin 20 mL, 10 kDa cut-off, *Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Germany) auf 4 – 5 mL eingengt und über eine HiLoad 16/600 Superdex 75 SEC-Säule (*GE Healthcare*, Fairfield, USA) aufgereinigt (1x SEC-Puffer A, 0.5 mL/min, 5 mL-loop). Die Rhodensain-Fractionen wurden vereinigt und 2 h bei 4 °C gegen MilliQ-H₂O dialysiert, umgehend lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die verwendeten Medien und Puffer sind in Tabelle 38 aufgelistet.

8.6.2 Gewinnung von ¹⁵N-markiertem Rhodensain aus *P. pastoris*

Tabelle 39: Verwendete Medien für die Proteinexpression von ¹⁵N-markiertem Rhodensain aus *P. pastoris*.

Puffer/Medium	Zusammensetzung
Vorkulturmedium	20 mL 10x YNB, 20 mL Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 6.0, autoklaviert), 4 mL 50% Glycerol (v/v), 0.4 mL 500x Biotin, 200 µL 1000x Ampicillin, 1.5 g ¹⁵ N-Ammoniumchlorid mit H ₂ O (autoklaviert) auf 200 mL aufgefüllt
Hauptkulturmedium	20 mL 10x YNB, 20 mL Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 6.0, autoklaviert), 1 mL Methanol, 0.4 mL 500x Biotin, 200 µL 1000x Ampicillin, 1.5 g ¹⁵ N-Ammoniumchlorid mit H ₂ O (autoklaviert) auf 200 mL aufgefüllt

Zur Synthese von ¹⁵N-markiertem Rhodensain wurden die beschriebenen *P. pastoris*-Klone in 200 mL Vorkulturmedium bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 6 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4,500 g und RT für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 100 mL Phosphatpuffer (100 mM, pH 6.0) resuspendiert, erneut bei 4,500 g und RT für 10 min zentrifugiert und in 200 mL Hauptkulturmedium aufgenommen. Die Expression wurde durch die Zugabe von 1 mL Methanol in 6 h-Abständen über 24 h bei 25 °C induziert. Die Reinigung des Enzyms erfolgte analog zu der unter 8.6.1 beschriebenen Methode. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 39 angegeben.

8.6.3 Gewinnung von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem Rhodospain aus *P. pastoris*Tabelle 40: Verwendete Medien für die Proteinexpression von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem Rhodospain aus *P. pastoris*

Puffer/Medium	Zusammensetzung
Vorkulturmedium	5 mL 10x YNB, 5 mL Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 6.0, autoklaviert), 0.25 g D-Glucose- $^{13}\text{C}_6$, 0.1 mL 500x Biotin, 50 μL Ampicillin, 0.38 g ^{15}N -Ammoniumchlorid mit H_2O (autoklaviert) auf 50 mL aufgefüllt
Hauptkulturmedium	5 mL 10x YNB, 5 mL Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 6.0), 250 μL ^{13}C -Methanol, 0.1 mL 500x Biotin, 50 μL Ampicillin, 0.38 g ^{15}N -Ammoniumchlorid mit H_2O (autoklaviert) auf 50 mL aufgefüllt

Die Synthese und Aufreinigung von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem Rhodospain erfolgte analog zu der unter 8.6.2 beschriebenen Methode in einer 50 mL Vor- und Hauptkultur. Anstelle von Glycerol wurde in der Vorkultur D-Glucose- $^{13}\text{C}_6$ (*Sigma-Aldrich*) verwendet. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 250 μL ^{13}C -Methanol (*Sigma-Aldrich*) im Abstand von 6 h induziert und die Zellen für 48 h bei 25 °C inkubiert. Die Pufferzusammensetzungen von Vor- und Hauptkultur sind in Tabelle 40 angegeben.

8.7 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

8.7.1 Vorbereitung chemisch kompetenter Zellen

E. coli Zellen wurden in 100 mL *lysogeny broth* (LB)-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.5 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur bei 4,000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in 5 mL einer eiskalten CaCl₂-Lösung (50 mM, autoklaviert) resuspendiert und erneut für 10 min bei 4,000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen erneut in 5 mL eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen und für 2 h auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1.33 mL 80%igem Glycerol (v/v) und 10 minütiger Inkubation wurden die Zellen in 100 µL Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

8.7.2 Transformation

100 µL chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden mit 20 – 50 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C, wonach die Zellen umgehend für weitere 2 min auf Eis inkubiert wurden. Nach Zugabe von 300 µL LB-Medium wurden diese für 1 h bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 3 min mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert und 350 µL Überstand entfernt. Die Zellen wurden erneut in dem verbleibenden Medium aufgenommen, auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und für 16 h bei 37 °C inkubiert.

8.7.3 Expression von (Pro-)Rhodesain in *E. coli*

Gene, die für Rhodesain-Mutanten codieren, wurden auf pET-11a-Plasmiden (siehe 8.17) in kompetente Rosetta 2 (DE3) pLysS Zellen transformiert (siehe 8.7.2). Die Zellen wurden auf LB-Agar mit 50 µg/mL Chloramphenicol und 100 µg/mL Ampicillin ausplattiert und 16 h bei 37 °C inkubiert, in 100 mL LB-Medium mit 50 µg/mL Chloramphenicol und 100 µg/mL Ampicillin überführt und für weitere 16 h bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden 2 – 3 L LB-Medium mit 2 Vol% der Vorkultur angeimpft und die Zellen bei 37 °C und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 – 0.5 kultiviert. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (0.5 mM finale Konzentration) induziert und die Zellen bei 19.5 °C für weitere 20 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4,500 g bzw. 10,000 g geerntet, der Überstand verworfen und die Zellen direkt aufgeschlossen oder bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 41: Verwendete Puffer und Medien zur Gewinnung von katalytisch aktivem Rhodensain aus *E. coli*.

Puffer/Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 5 g NaCl mit H ₂ O (autoklaviert) auf 100 mL aufgefüllt
Lysis-Puffer	50 mM Tris pH 8.5, 75 mM NaCl, 10 mM Imidazol, DNase I, RNase, Lysozym, 10 mM Benzamidin
Puffer 1	50 mM Tris pH 8.5, 75 mM NaCl, 10 mM Imidazol
Puffer 2	50 mM Tris pH 8.5, 75 mM NaCl, 20 mM Imidazol
Puffer 3	50 mM Tris pH 8.5, 75 mM NaCl, 100 mM Imidazol
TEV-Hydrolyse-Puffer	50 mM Tris pH 8, 10 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 3 mM Glutathion (GLT, red.) , 0.3 mM GLT (ox.)
AEX-Puffer A	20 mM NaOAc pH 5.0
AEX-Puffer B	20 mM NaOAc pH 5.0, 500 mM NaCl
SEC-Puffer A	20 mM Natriumcitrat pH 5.0, 200 mM NaCl
SEC-Puffer B	50 mM Tris pH 8.0, 200 NaCl

8.7.4 Isolierung von katalytisch aktivem Rhodensain aus *E. coli*

E. coli-Zellen wurden in 35 mL Lysis-Puffer/1 L Expressionsansatz aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 8 – 10 Mal sonifiziert (45 s, 5 Zyklen, 55%) und bei 13,000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Ni-NTA-Säule (4 mL/1 L Expressionsmedium, *Quiagen*) aufgetragen, welche mit Puffer 1 vorinkubiert wurde. Nach vollständigem Auftragen der löslichen Fraktion wurde die Säule mit 1 Säulenvolumen (*column volume, CV*) Puffer 1 und 2 CV Puffer 2 gewaschen, bevor das Protein mit 3 CV Puffer 3 eluiert wurde. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und die Proteinkonzentration durch Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Die vereinigten Fraktionen wurden mit TEV-Protease (Rhodensain : TEV = 10 : 1 (n : n)) versetzt und über Nacht bei 4 °C gegen 1 L TEV-Hydrolyse-Puffer dialysiert (Dialysemembran: ZelluTrans 3 kDa *cut-off*, *Carl Roth*, Karlsruhe, Deutschland). Anschließend wurde die Lösung bei RT mit DTT versetzt (finale Konzentration = 2 mM) und mit 200 mM Citratpuffer (pH 3.0) auf pH 4.0 eingestellt. Eventuell entstehender Niederschlag wurde durch Zentrifugation entfernt und die zunehmende katalytische Aktivität des Enzyms mit Hilfe des fluoreszenzbasierten Enzymassays bis zum Erreichen des Aktivitätsmaximums überwacht (siehe 8.8.4). Das Enzym wurde umgehend durch die Zugabe von KTT (finale Konzentration = 5 mM) und Phenylmethylsulfonylfluorid (**PMSF**) (finale Konzentration = 2 mM) inhibiert. Der Ansatz wurde für 4 h gegen 2 L AEX-Puffer A dialysiert und anschließend über eine 5 mL HiTrapQ-Säule (*GE*

Healthcare, Fairfield, USA) aufgereinigt (siehe Tabelle 42). Die Elutionsfraktionen wurden bei 4 °C und 5,000 g über Zentrifugationsfilter (Vivaspin 20 mL, 10 kDa *cut-off*, *Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Deutschland) aufkonzentriert und über eine HiLoad 16/600 Superdex 75 SEC-Säule (*GE Healthcare*, Fairfield, USA) aufgereinigt (SEC-Puffer A, 0.5 mL/min, 5 mL-loop). Die Rhodessain-Fractionen wurden vereinigt, 2 h bei 4 °C gegen H₂O dialysiert, umgehend lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 42: Programm des AEX-Laufs von katalytisch aktivem Rhodessain aus *E. coli*.

Stufe	Beschreibung
Injektion	2 mL/min über <i>sample pump</i> oder 5 mL-loop
Waschen	2 mL/min, 100% Puffer A, 15 mL
Elution	2 mL/min, Gradient = 0% Puffer B – 100% Puffer B, 35 min

8.7.5 Gewinnung von katalytisch inaktivem Rhodessain aus *E. coli*

Transformation, Expression sowie Ernte, Lyse, Aufreinigung über Ni-NTA und TEV-Hydrolyse wurden analog zu der oben beschriebenen Gewinnung von aktivem Rhodessain durchgeführt (8.7.4). Nach der Dialyse gegen den TEV-Hydrolyse-Puffer wurde das Proteingemisch erneut auf eine mit Puffer 1 vorinkubierte Ni-NTA-Säule aufgetragen und diese mit weiteren 2 CV Puffer 1 gewaschen, wobei inaktives Pro-Rhodessain von GFP und TEV-Protease erfolgreich abgetrennt werden konnte. Der Durchfluss sowie die Puffer 1-Elutionen wurden vereinigt und auf 4 – 5 mL durch Zentrifugationsfilter (Vivaspin 20 mL, 10 kDa *cut-off*, *Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Deutschland) aufkonzentriert. Die Protein-Lösung wurde anschließend über eine HiLoad 16/600 Superdex 75 SEC-Säule (*GE Healthcare*, Fairfield, USA) aufgereinigt (SEC-Puffer B; 0.5 mL/min, 5 mL-loop), dialysiert, lyophilisiert und bei -80 °C gelagert.

8.7.6 Expression von T7-RNA-Polymerase

Tabelle 43: Puffer und Medien, die zur Expression und Aufarbeitung der T7-RNA-Polymerase und der Y639F-Mutante verwendet wurden.

Puffer/Medium	Zusammensetzung
Lysis-Puffer	50 mM Tris pH 8.5, 75 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 5% Glycerol, DNase I, RNase, Lysozym, 10 mM Benzamidin
Puffer A	50 mM Tris pH 8.5, 75 mM NaCl 10 mM Imidazol
Puffer B	50 mM Tris pH 8.5, 75 mM NaCl, 300 mM Imidazol
SEC-Puffer C	50 mM Tris pH 8.0, 100 NaCl

Für die Expression der T7-RNA-Polymerase in *E. coli* wurde das pQE-80-T7WT-Plasmid über *Addgene* (Watertown, Massachusetts, USA <https://www.addgene.org/102790/>) erworben und in XL10-Zellen amplifiziert. Das isolierte Plasmid wurde nach dem unter 8.7.2 beschriebenen Protokoll in BL21-Zellen transformiert und diese auf LB-Agar mit Kanamycin (50 µg/mL) ausplattiert. Transformierte Zellen wurden in 50 mL LB-Medium mit 50 µg/mL Kanamycin überführt und 16 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. 2 L LB-Medium mit 50 µg/mL Kanamycin wurden mit 40 mL Vorkultur angeimpft und bei 37 °C kultiviert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀ von 0.5 – 0.6 mit 0.5 mM IPTG-Endkonzentration und 30 °C für 20 h.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 10,000 g für 30 min und 4 °C geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 mL Lysis-Puffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10x auf Eis sonifiziert (45 s, 5 Zyklen, 55%) und die unlösliche Fraktion durch Zentrifugation bei 4 °C und 13,000 g abgetrennt. Die lösliche Fraktion wurde über eine *sample pump* mit 2 mL/min auf eine 5 mL HisTrap-Säule (*GE Healthcare*, Fairfield, USA) aufgetragen, mit 15 mL Puffer A (2 mL/min) gewaschen und durch steigende Imidazolkonzentration eluiert (Gradient: 0% Puffer B – 100%Puffer B, 35 min, 2 mL/min). Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und nach Einengen auf 5 mL durch einen Zentrifugationsfilter (Vivaspin 20 mL, 10 kDa *cut-off*, *Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Deutschland) bei 5,000 g und 4 °C über eine HiLoad 16/600 Superdex 200 SEC-Säule (*GE Healthcare*, Fairfield, USA) aufgereinigt (SEC-Puffer C, 1 mL/min, 5 mL *loop*). Die Elutionsfraktionen wurden erneut vereinigt und bei 4 °C gegen 50 mM Tris-Puffer (pH 7.9, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA) dialysiert, mit 50 Vol% Glycerol versetzt und bei -20 °C gelagert. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 43 aufgelistet.

8.8 Methoden zur Charakterisierung von Rhodesain-Inhibitor-Bindungen

8.8.1 ITC-Messung

Tabelle 44: In ITC-Messungen verwendete Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
Acetat-Puffer	50 mM NaOAc pH 5.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 5 Vol% DMSO
Piperazin-Puffer	50 mM Piperazin pH 5.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 5 Vol% DMSO

Die isothermale Titrationskalorimetrie wurde an einer MicroCal PEAQ-ITC (*Malvern Panalytical*, Almelo, Niederlande) bei 25 °C durchgeführt und mit Hilfe der *kinITC-ETC-Software* (*AFFINImeter*, Santiago de Compostela, Spanien, www.affinimeter.com) ausgewertet.

Klassische ITC-Bindungsstudien

Für jedes ITC-Experiment wurden 400 µL einer 20 µM Rhodesain-Lösung in der Messzelle und 200 µL Ligandenlösung in unterschiedlichen Konzentrationen in der Spritze vorgelegt. Die Experimente wurden bei 25 °C und 2.5 µL/Injektion über 19 Injektionen durchgeführt. Die Konzentration des Liganden wurde basierend auf K_i -Werten aus dem fluoreszenzbasierten Enzymassay festgelegt, um einen Wiseman-Faktor c zwischen 50 – 500 zu erzielen. Dieser wurde nach der folgenden Gleichung (11) berechnet:

$$c = K_a \cdot [M]_{tot} \cdot N \quad (11)$$

Dabei entspricht K_a der erwarteten Assoziationskonstante zwischen Inhibitor und Enzym, $[M]_{tot}$ der Enzymkonzentration in der Messzelle und N dem stöchiometrischen Verhältnis der Enzym-Inhibitor-Bindung.

Die Auswertung der erhaltenen Kurven erfolgte durch die *kinITC-ETC-Software* (*AFFINImeter*, Santiago de Compostela, Spanien, www.affinimeter.com), wobei ein Reaktionsverhältnis N zwischen Ligand und Enzym als 1 angenommen und die Konzentration an Rhodesain entsprechend gefittet wurde. Eine vollständige Liste der getesteten Liganden ist in Tabelle 73 aufgeführt. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 44 aufgelistet.

kinITC-ETC

Zur Bestimmung des ETC-Fits wurden die ITC-Daten aus den Inhibitor-Rhodesain-Bindungsstudien mit Hilfe der *kinITC*-Software (*AFFINImeter*, Santiago de Compostela, Spanien, www.affinimeter.com) ausgewertet. Dazu wurde das Reaktionsverhältnis zwischen Rhodesain und Liganden N als 1 angenommen. Die Equilibrierungszeit wurde als Zeitraum zwischen dem Start der Titration und dem Zeitpunkt, an welchem das Signal die Basislinie erreichte, manuell festgelegt. Aus den erhaltenen k_{off} - und K_D -Werten wurde der k_{on} -Wert nach Formel (12) berechnet:

$$k_{\text{on}} = \frac{k_{\text{off}}}{K_D} \quad (12)$$

Dabei entspricht k_{on} der Assoziationszeitkonstante, k_{off} der Dissoziationszeitkonstante und K_D der Dissoziationskonstante.

8.8.2 MST-Messungen

MST-Messungen wurden an einem Monolith NT.115 pico (*NanoTemper*, München, Deutschland) durchgeführt. Für die Messung wurde eine 20 nM Rhodesain-S279C-Cy5-Lösung (50 mM NaOAc, 200 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.0025% (m/m) Brij35, pH 5.5) 1 : 1 mit einer 50 μ M Lösung der Verbindung **2** im identischen Puffer gemischt. Die Herstellung der Inhibitorlösung erfolgte durch Verdünnung einer 4 mM Stammlösung. Als Kontrolle wurde reines DMSO auf identische Weise, wie der Ligand verdünnt und ebenfalls im Verhältnis 1 : 1 (v : v) mit der 20 nM Rhodesain-Lösung versetzt. Die Messung wurde bei 24.5 °C, 100% *excitation power* und 40% *MST-power* durchgeführt.

8.8.3 SPR-Messungen

SPR-Messungen wurden an einem Reichert SR7000DC SPR Spektrometer (*Ametek*, Unterschleißheim, Deutschland) durchgeführt, welches mit einem SAHC-Chip (*Xantec*, Kevelaer, Deutschland) beladen wurde. Zur Vorbereitung wurde der Chip mit Enzympuffer (50 mM NaOAc pH 5.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA) equilibriert und anschließend mit 200 μ L einer 10 μ M Lösung an biotinyliertem Rhodesain in Laufpuffer bei 50 μ L/min inkubiert. Das System wurde bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie mit Enzympuffer bei einer konstanten Flussrate von 100 μ L/min gespült. Die Messung der Assoziation wurden nach Equilibrieren mit Inhibitorpuffer (50 mM NaOAc pH 5.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 5 Vol% DMSO) durch die Injektion von Inhibitoren unterschiedlicher Konzentrationen in Inhibitorpuffer gestartet und bis zum Erreichen eines Plateaus im Sensorgramm verfolgt. Die Dissoziation wurde während des Spülens mit Inhibitorpuffer bis zum Erreichen der Basislinie verfolgt.

8.8.4 Fluoreszenzbasierter Enzymassay

Zur Bestimmung der katalytischen Enzymaktivität von Rhodesain wurde ein fluoreszenzbasierter Enzymassay verwendet, in welchem die Substanz Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-arginin-7-amidomethylcoumaryl (**Z-Phe-Arg-AMC**; *Bachem*, Bubendorf, Schweiz) als Substrat eingesetzt wurde. Durch die Enzym-katalysierte Hydrolyse des Substrats wird während der Reaktion Aminomethylcoumarin (**AMC**) freigesetzt, welches bei 380 nm angeregt werden kann und daraufhin bei 460 nm Licht emittiert. Da die Intensität an emittiertem Licht proportional zur umgesetzten Substratmenge ist, kann durch diesen Assay die katalytische Enzymaktivität bestimmt werden. Dazu wird das Fluoreszenzsignal gegen die Zeit aufgetragen, wobei sich die Enzymaktivität aus der Steigung der Regressionsgeraden ergibt. Dieser Assay kann daher für Inhibitionsstudien und zur Beschreibung des Enzyms durch charakteristische Konstanten (K_M und v_{max}) herangezogen werden. Die Detektion der Fluoreszenz geschah mittels eines Fluorimeter *F2000* (*Tecan*, Männedorf, Schweiz) bei 50facher Verstärkung und 25 °C.

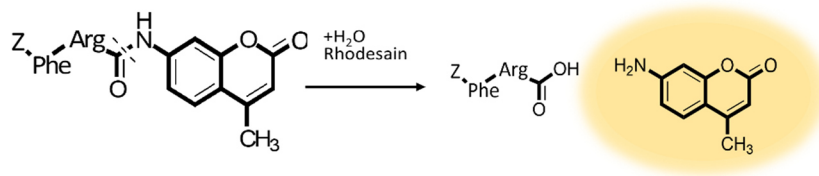


Abbildung 107: Enzym-katalysierte Hydrolyse des Z-Phe-Arg-AMC-Substrats durch Rhodesain oder andere Proteasen. Das freigesetzte Aminomethylcoumarin kann bei einer Wellenlänge von 380 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 460 nm bestimmt werden.

IC₅₀--Bestimmung

Zur Bestimmung von konzentrationsabhängiger Inhibition unterschiedlicher Verbindungen wurde das in Tabelle 45 angegebene Pipettierschema verwendet:

Tabelle 45: Pipettierschema zur Bestimmung von IC₅₀-Werten.

Reagenz	Volumen [μL]
Assay-Puffer	185
DMSO/Inhibitor-Lsg.	5
Rhodesain-Lsg.	5
Z-Phe-Arg-AMC (400 μM in DMSO)	5

Eine Rhodesain-Stammlösung wurde dazu in Assay-Puffer (50 mM NaOAc pH 5.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.005% Brij35 (w/w)) bei Raumtemperatur vorinkubiert und verdünnt, bis eine lineare Zunahme der Fluoreszenz über mindestens 5 min zu beobachten war. Inhibitoren wurden in DMSO aufgenommen und nach folgendem Schema verdünnt.

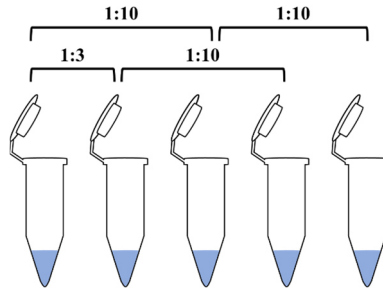


Abbildung 108: Pipettierschema zum Erstellen der Verdünnungsreihen.

Zur Bestimmung des IC_{50} wurden dabei Inhibitorkonzentrationen eingesetzt, die mindestens den Bereich eines 0.1 – 10fachen IC_{50} abdeckten, wobei reines DMSO als Kontrolle verwendet wurde. Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *GraFit* (Version 5.0.13) nach Formel (13):

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^s} \quad (13)$$

Dabei entspricht y der gemessenen katalytischen Restaktivität bei einer Inhibitorkonzentration x und s dem *slope factor*.

K_M - und v_{max} -Bestimmung

Die Bestimmung der K_M -Werte erfolgte nach folgendem Pipettierschema (Tabelle 46), wobei unterschiedliche Substratkonzentrationen und eine Enzymkonzentration von 90 ng/mL im *well* eingesetzt wurden.

Tabelle 46: Pipettierschema zur Bestimmung des K_M - und v_{max} -Wertes.

Reagenz	Volumen [μ L]
Assay-Puffer	185
DMSO	5
Rhodesain-Lsg.	5
Z-Phe-Arg-AMC (in DMSO)	5

Die Verdünnung des Substrats erfolgte dabei nach dem in Abbildung 108 angegebenen Schema ausgehend von einer 4 mM Stammlösung.

Tabelle 47: K_M - und v_{max} -Werte aktiver Rhodessain-Mutanten unter Verwendung des Substrats Z-Phe-Arg-AMC bei einer Rhodessain-Konzentration von 90 ng/mL im well.

Mutante	v_{max} [Δ FU/s]	K_M [μ M]
WT-Rhodessain (<i>P. pastoris</i>)	4.04 ± 0.12	5.79 ± 0.5
WT-Rhodessain (<i>E. coli</i>)	2.3 ± 0.04	5.82 ± 0.31
Rhodessain-Q127W	2.95 ± 0.1	9.84 ± 1.18
Rhodessain-F167W	1.74 ± 0.05	2.1 ± 0.24
Rhodessain-Q265W	0.53 ± 0.03	1.73 ± 0.55
Rhodessain-S279C	1.73 ± 0.26	12.7 ± 2.37
Rhodessain-S279C-Biotin	2.97 ± 0.13	6.53 ± 1.02
Rhodessain-S279C-Cy5	1.62 ± 0.05	5.73 ± 0.73

Die Assays wurden bei RT gemessen und K_M - und v_{max} -Werte durch die doppelt-reziproke Lineweaver-Burk-Auftragung oder durch *fitting* in *GraFit*[®] (5.0.13, Erithacus Software) nach Formel (14)

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (14)$$

ermittelt, wobei v der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer bestimmten Substratkonzentration $[S]$ entspricht.

8.9 Kristallisation, X-ray-Messung und Lösung der Kristallstruktur

Allgemeines Protokoll zur Kristallisation:

24 *well*-Kristallisationsmikrotiterplatten (*Greiner Bio-One*, Kremsmünster, Österreich) wurden mit 600 μ L unterschiedlichen Reservoir-Pufferlösungen befüllt, wobei jeweils zwei verschiedene Parameter der Zusammensetzung variiert wurden. Anschließend wurden Protein- und Reservoir-Lösung in einem Verhältnis von 1 : 1, 2 : 3 oder 2 : 1 mit einem Gesamtvolumen von 3 μ L auf einem Deckglaschen gemischt und die Kammer durch Schliff fett versiegelt. Die Kontrolle auf Kristallwachstum fand in regelmäßigen Abständen durch ein Mikroskop statt.

Kristallisation für Pro-Rhodessain-C131A:

Lyophilisiertes Pro-Rhodesain-C131A wurde zu einer Konzentration von 7 mg/mL in 10 mM Natriumcitrat-Puffer (pH 5.0) gelöst und 1 : 1 (v : v) mit Reservoir-Lösung (40 mM Citrat pH 3.5, 30% PEG-6000, gesättigt Pb(OAc)₂) versetzt. Die Ansätze wurden bei RT nach der *hanging drop*-Methode auskristallisiert.

Strukturbestimmung des Pro-Rhodesains

Die Streubilder wurden an einem Bruker AXS Microstar-H Generator (*Bruker AXS*, Karlsruhe, Deutschland) mit einem MAR-scanner 345 mm *image-plate detector* (*marXperts*, Norderstedt, Deutschland) mit einer X-ray Wellenlänge von 1.5417 Å in 1 °-Schritten und 10 min Exposition in 350 mm Abstand zum Detektor aufgenommen. Zuvor wurde der Kristall in Reservoir-Puffer mit zusätzlich 10 Vol% Glycerol inkubiert und durch einen 100 K N₂-*cryostream* stabilisiert. Die Prozessierung der Daten erfolgte durch *integration* und *scaling* durch die Programme XDS oder Ccp4 (Leslie, 2006; Winn et al., 2011; Barty et al., 2011).^{[188][189][190]} Die Struktur wurde durch *molekulare replacment* und *model build* mit PhaserMR innerhalb der Phenix *work suites* erstellt. Als *templat* wurde der PDB-Eintrag 2P7U nach Entfernen des Liganden und aller Wassermoleküle genutzt und die Struktur durch *WinCoot refinet*.^[191]

8.10 Rhodesain-Markierung

Für die Markierung von Rhodesain wurde das Pro-Rhodesain-C3S-S279C-GFP-Konstrukt verwendet. Die Markierung wurde mit den Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Chromatographie durchgeführt (siehe 8.7.4).

Mal-PEG-Assay

Für den Mal-PEG-Assay wurden abweichende Konzentrationen an Mal-PEG (*IrisBiotech GmbH*, Marktredwitz, Deutschland) mit einem Molekulargewicht von 5475 Da eingesetzt. Dabei wurden 7 mL einer Pro-Rhodesain-C3S-S279C-GFP-Lösung (1 mg/mL, 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP) mit 0.0, 2.1, 10.5 und 21.0 µL Mal-PEG-Lösung (50 mM in DMSO) versetzt und für 2 h bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden 1 h gegen 1 L TEV-Hydrolyse-Puffer dialysiert (siehe 8.17), mit 423 µL TEV-Protease (26.5 µM) versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Protein analog zu 8.7.3 bei pH 4.0 und 5 mM DTT aktiviert und die Zunahme der katalytischen Aktivität im fluoreszenzbasierten Enzymassay verfolgt. Die Proben für die Analyse mittels 14%iger SDS-PAGE wurden nach Erreichen des Aktivitätsmaximums entnommen und umgehend denaturiert.

Markierung mit Cy5-Farbstoff

Die Markierung mit Cy5-Farbstoff (Amersham Maleimide *Mono-Reactive Dye*, GE Healthcare, Fairfield, USA) wurde unter Lichtausschluss durchgeführt. Dabei wurden 1 mg Pro-Rhodesain-S279C-

GFP in 1 mL Cy5-Markierungspuffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, 1 *vial* Cy5 *Mono-Reactive Dye*, 5 Vol% DMF) aufgenommen und 2 h bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Der Ansatz wurde auf eine NAP-25 Säule (*GE Healthcare*, Fairfield, USA) aufgetragen und das Protein mit TEV-Hydrolyse-Puffer eluiert. Dabei wurden freier Farbstoff und Protein voneinander abgetrennt. Nach TEV-Hydrolyse (siehe 8.7.3) wurde markiertes Cy5-Pro-Rhodesain-S279C mittels AEX über eine 5 mL HiTrapQ-Säule (*GE Healthcare*, Fairfield, USA, siehe

Tabelle 48) von TEV-Protease, GFP und nicht-markiertem Rhodesain abgetrennt (siehe Abbildung 117) und die Markierungseffizienz photometrisch bestimmt:

$$\text{Markierungseffizienz} = \frac{c_{\text{Cy5}}}{c_{\text{Pro-Rhodesain}}} = \frac{2.9 \cdot A_{650}}{A_{280} - (0.05 \cdot A_{650})} \quad (15)$$

Dabei entspricht A der Absorption bei der jeweiligen Wellenlänge.

Die Aktivierung erfolgte ebenfalls analog zu 8.7.3.

Tabelle 48: Verwendete Puffer und AEX-Schritte zur Aufreinigung von Cy5-markiertem Pro-Rhodesain-C3S-S279C.

Stufe/Puffer	Beschreibung
AEX-Puffer C	20 mM Tris pH 8.0
AEX-Puffer D	20 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl
Injektion	2 mL/min über <i>sample pump</i> oder 5 mL- <i>loop</i>
Waschen	2 mL/min, 100% Puffer C, 15 mL
Elution	2 mL/min, Gradient = 0% Puffer D – 100% Puffer D, 35 min

Markierung mit Maleimid-Biotin

Für die Markierung von Rhodesain mit Maleimid-Biotin (*N*-Biotinoyl-*N'*-(6-maleimidohexanoyl)hydrazide, *Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Deutschland) wurde von der Ni-NTA-Chromatographie eluiertes Pro-Rhodesain-C3S-S279C-GFP mit Hilfe eines Zentrifugationsfilters (Vivaspin 20 mL, 10 kDa *cut-off*, *Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Deutschland) bei 4,500 *g* und RT in Biotin-Markierungspuffer (10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP) überführt.

Die Pro-Rhodesain-C3S-S279C-Lösung (1 mg/mL) wurde mit Maleimid-Biotin in DMSO (finale Konzentration 0.14 mM Maleimid-Biotin, 5 Vol% DMSO) versetzt und anschließend für 2 h bei RT inkubiert. Das Gemisch wurde bei 4,500 *g* und 4 °C auf 30 mL durch Zentrifugationsfiltrierung eingengt und für 2 h gegen Tris-Puffer (50 mM Tris pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) bei 4 °C dialysiert (Dialysemembran: Zellutrans 3 kDa *cut-off*, *Carl Roth*, Karlsruhe, Deutschland), um überschüssiges Biotin zu entfernen. Anschließend erfolgte die Zugabe von TEV-Protease (Pro-

Rhodesin-S279C-GFP : TEV = 10 : 1 (n : n)) und Dialyse bei 4 °C gegen TEV-Hydrolyse-Puffer (50 mM Tris pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 3 mM GLT (red.), 0.3 mM GLT (ox.)) über Nacht. Das Biotin-markierte Pro-Rhodesain wurde analog zu 8.7.4 aktiviert und mittels Spinfiltration (4,500 g, 4 °C, Vivaspin 20 mL, 10 kDa *cut-off*, *Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Germany) in 20 mM Piperazin-Puffer (pH 5.2) überführt. Die Aufreinigung erfolgte mittels AEX-Chromatographie über eine HiTrap® Q HP 5 mL-Säule (siehe Tabelle 49). Das eluierte Enzym wurde für 2 h bei 4 °C gegen H₂O dialysiert, lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 49: Verwendete Puffer und AEX-Schritte zur Aufreinigung von Biotin-markiertem Rhodesain-S279C.

Stufe/Puffer	Beschreibung
AEX-Puffer E	20 mM Piperazin pH 5.2
AEX-Puffer F	500 mM Tris pH 5.2, 500 mM NaCl
Injektion	2 mL/min über <i>sample pump</i> oder 5 mL- <i>loop</i>
Waschen	2 mL/min, 100% Puffer E, 15 mL
Elution	2 mL/min, Gradient = 0% Puffer F – 100% Puffer F, 35 min

8.11 Gel-*shift*-Assay

Tabelle 50: Zusammensetzung der Puffer des Gel-shift-Assays.

Puffer	Zusammensetzung
Acetat pH 4	50 mM NaOAc pH 4.0, 235 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.005% Brij35
Acetat pH 5.5	50 mM NaOAc pH 5.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.005% Brij35
Bis-Tris pH 6.5	50 mM Bis-Tris pH 6.5, 229 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.005% Brij35
Tris pH 8	50 mM Tris pH 8.0, 221 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.005% Brij35

Lyophilisate von katalytisch inaktiven Pro-Rhodesain-Mutanten wurden zu einer Konzentration von 0.5 mg/mL in den jeweiligen Puffern gelöst (siehe Tabelle 50). Katalytisch aktives WT-Rhodesain wurde in 50 mM Acetatpuffer (pH 5.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM DTT) aufgenommen und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Pro-Rhodesain-Lösung mit aktivem Rhodesain versetzt (Pro-Rhod. : WT-Rhod. = 100 : 1 (n : n)) und bei 37 °C inkubiert. Der Mischung wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten 16 µL Proben entnommen, mit 5 µL 4x Lämmli-Puffer versetzt und die Proteine umgehend für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Analyse der Proben erfolgte anschließend mittels einer 15%igen SDS-PAGE. Die Auswertung der Gele erfolgte durch das Programm *ImageJ* (Version 1.52q). Dazu wurden die Pro-Rhodesain-Banden der einzelnen Zeitpunkte integriert und auf die Pro-Rhodesain-Bande zum Zeitpunkt t = 0 normiert.

8.12 Autoaktivierungsassay

Die Rhodesain-Mutanten wurden in *E. coli*, wie unter 8.7.5 beschrieben, exprimiert und über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Die Elutionsfraktionen wurden mit PMSF versetzt (2 mM finale Konzentration), um eine vorzeitige Autoaktivierung zu verhindern. Die Enzymkonzentration wurde durch Zugabe des Elutionspuffers (50 mM Tris, pH 8.5, 75 mM NaCl, 100 mM Imidazol) auf 0.5 mg/mL eingestellt. Die Aktivierung bei pH 4.0 wurde durch die Zugabe von 450 μ L Citrat-Lösung (200 mM pH 3.0) und 25 μ L DTT (200 mM) zu 550 μ L Enzymlösung induziert und das Gemisch bei 37 °C inkubiert. Für die Aktivierung bei pH 8.0 wurde anstelle der Citrat-Lösung ein 200 mM Tris-Puffer (pH 7.2) verwendet. Die katalytischen Aktivitäten der jeweiligen Ansätze wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten im FBE bestimmt. Dazu wurden 185 μ L Assaypuffer (50 mM NaOAc pH 5.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.005% Brij35 (w/w)) mit 10 μ L Ansatz und 5 μ L Substrat (400 μ M in DMSO) versetzt und die Fluoreszenzentwicklung umgehend bei einer Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge von 380 bzw. 460 nm verfolgt (siehe 8.13).

8.13 Verdau des trypanosomalen *blocking peptide* durch Rhodesain

5 μ L einer 1 mM wässrigen Lösung des trypanosomalen *blocking peptide* wurden in 41 μ L Puffer (50 mM AcOH pH 4.0, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA) aufgenommen und mit 2.5 μ L einer 100 mM DTT-Lösung versetzt. Anschließend wurden 2 μ L Rhodesain-Lösung (0.08 mg/mL) hinzugefügt und das Gemisch für 1 h bei RT inkubiert. Für die Analyse wurden 10 μ L des Ansatzes mittels LC-MS analysiert.

Tabelle 51: LC-MS-Protokoll und Laufmittel zur Analyse des blocking-peptide-Verdaus durch Rhodesain.

	Laufmittel	t [min]	A [%]	B [%]	C [%]	Flussrate [mL/min]
A	H ₂ O + 0.1% Ameisensäure	8	50	50	0	0.7
B	ACN	11	100	0	0	0.7

8.14 Hydrolyse-Assays der Verbindung 4.8

Rhodesain aus *P. pastoris* und aus *E. coli* sowie mit K11777 inaktiviertes Rhodesain wurden in 99 μ L Assaypuffer (50 mM NaOAc pH 5.5, 200 mM, 5 mM EDTA, 5 mM DTT) zu einer finalen Konzentration von 1 mg/mL verdünnt. Anschließend wurden 1 μ L einer DMSO-Lsg. des Inhibitors 4.7 (10 mg/mL) hinzugegeben und das Gemisch für 24 h bei RT inkubiert. Als Negativkontrolle wurde

1 mL der Inhibitorlösung in 99 μL Assaypuffer ohne Rhodesain aufgenommen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 μL ACN und Heizen auf 95 $^{\circ}\text{C}$ für 10 min gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 min bei 17,000 g zentrifugiert und der Überstand vor der Analyse mittels LC-MS durch einen 0.22 μm Spritzenfilter filtriert.

Die LC-MS-Analyse erfolgte an einem HP Agilent 1100 System mit gekoppelter LC/MSD *ion trap*. Die Auftrennung erfolgte über eine Agilent Poroshell 120 EC-C18 (150 x 2.10 mm) Säule bei 40 $^{\circ}\text{C}$ und einem isokratischen Fluss von 30% ACN and 70% H_2O mit 0.1% Ameisensäure. Die Methode zeigte eine Totzeit von 0.3 min bei einer Flussrate von 0.7 mL/min.

8.15 Verdünnungsassay

Der Verdünnungsassay wurde durch Zugabe von 50 μL Verbindung **4.8** (0.1 mM in DMSO) zu 950 μL Rhodesain (0.37 μM Endkonzentration) in Assay-Puffer (50 mM NaOAc pH 5.5, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl) und anschließender Vorinkubation für 45 min bei RT vorbereitet. Die Testung auf vollständige Inhibition erfolgte durch Zugabe von 5 μL einer 400 μM Z-Phe-Arg-AMC-Lösung (in DMSO) zu 195 μL der Rhodesain-Verb. **4.8**-Stammlösung. Die entstehende Fluoreszenz wurde analog zu 8.13 gemessen.

Zur Verdünnung wurden 193 μL Assaypuffer (pH 5.5 with 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5 mM DTT) mit 2 μL der Stammlösung versetzt und die Rückgewinnung der katalytischen Aktivität umgehend nach Zugabe von 5 μL der Substratlösung gemessen. Als Kontrolle wurde **4.8** durch reines DMSO ersetzt und der Ansatz identisch zur Probe behandelt.

8.16 RNA-Synthese und -Modifikationen

8.16.1 Amplifizierung des IVT-templates

Als Plasmid-*template* für die IVT wurde ein pU19-Plasmid verwendet, welches einen T7-Promotor *upstream* zur 2-16 RNA-Sequenz und *downstream* eine *AseI*-Schnittstelle trägt (siehe Abbildung 109). Die T7-RNA-Promotor-Sequenz mit anschließender Aptamer-Sequenz wurde zwischen den *EcoRI*- und *AseI*-Restriktionsschnittstellen eingefügt. Das entsprechende Plasmid wurde von *GenScript* (*GenScript Biotech Corporation*) synthetisiert und kommerziell erworben. Das Plasmid wurde in XL10-Gold Zellen transformiert und diese auf LB-Agar (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin) ausplattiert. Die Zellen wurden in 5 mL LB-Medium (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin) bei 37 $^{\circ}\text{C}$ über Nacht kultiviert und 0.5 mL der Vorkultur in 250 mL Hauptkultur (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin) injiziert. Die Kultur wurde für weitere 6 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend durch Zentrifugation bei 4 $^{\circ}\text{C}$ und 10,000 g geerntet. Das Plasmid wurde

mittels Plasmid Maxi-Kit (*Quiagen*, Stockach, Deutschland) isoliert, in 10 mM Tris-Puffer pH 8.5 aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

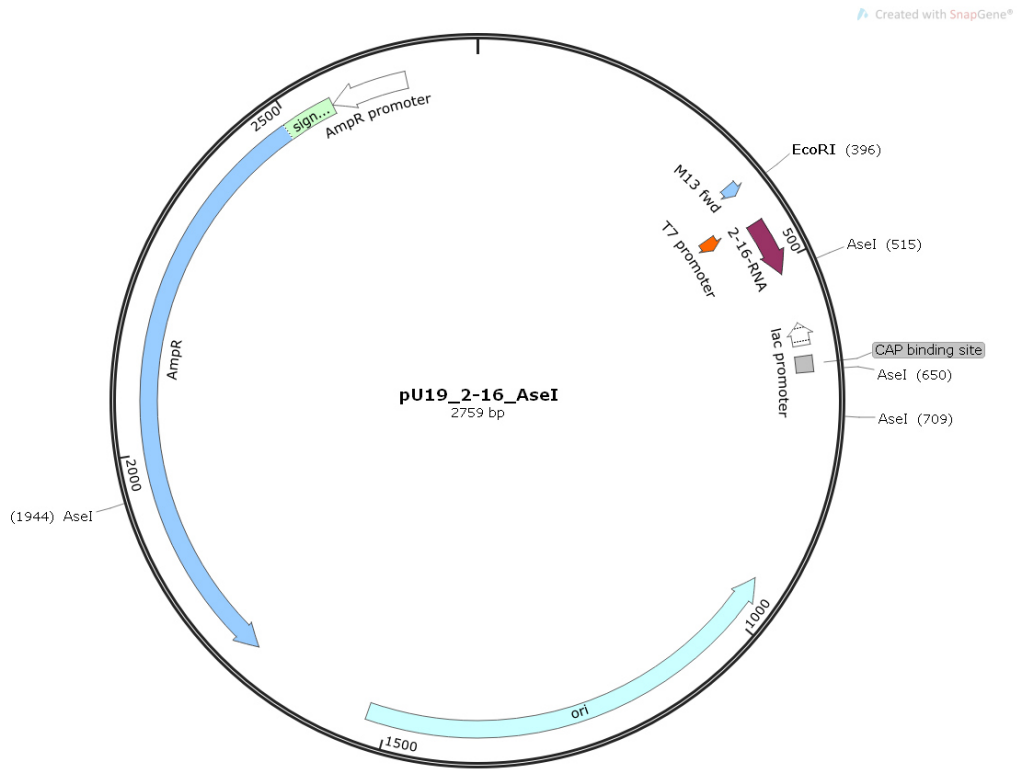


Abbildung 109: Plasmid-Karte des für IVT-verwendeten Plasmiden. Der T7-Promotor mit anschließender RNA-Aptamer-Sequenz wurde zwischen eine EcoRI- und AseI-Restriktionsschnittstelle in ein pUC19-Plasmid eingefügt. Weitere AseI-Restriktionsschnittstellen sind hervorgehoben.

Tabelle 52: Sequenzen der DNA, welche in das pUC-19 Plasmid insertiert wurde, und der RNA, welche aus der IVT resultiert. Der T7-Promotor wurde in der DNA-Sequenz unterstrichen und die transkribierten Nukleotide sind fett hervorgehoben. Die transkribierte RNA unterscheidet sich von dem publizierten 2-16-RNA-Aptamer durch ein zusätzliches 3'-terminales Adenosin (Rot).

Sequenzen 5' → 3'

DNA-Insert	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACGATATTCGTCCATCGG <u>GTGGCCCGTGTCTGAGCGGGACGGCCACTTGAGCGCCGCTGTCC</u> GACTGAATTAATA AGCTT
2-16-RNA-Derivat	GGGAGACGAUUAUCGUCCAUCGGGUGGCCCGUGUCUGAGCGGGGAC- GGCCACUUGAGCGCCGCUGUCCGACUGAAUUAU A

8.16.2 *AseI*-Verdau

6 μL des Plasmid-*templates* (3.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) wurden in 82 μL MilliQ-H₂O aufgenommen und mit 10 μL NEBuffer3.1 (*New England Biolabs*, Frankfurt) versetzt. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 2 μL *AseI* (10 U/ μL) gestartet und für 2 h bei 37 °C durchgeführt. Das Enzym wurde durch Heizen auf 65 °C für 30 min deaktiviert und der Verdau auf Vollständigkeit mittels eines 1%igen Agarosegels überprüft. Das vorbereitete *template* wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

8.16.3 IVT

Für die *in vitro* Transkription von nicht-modifizierter RNA wurden herkömmliche rNTPs verwendet. Für die Synthese 2'-*F*-modifizierter RNA wurden CTP und UTP gegen 2'-*F*-2'-Desoxy-UTP/CTP-Nukleotide ausgetauscht. Die Reaktion wurde nach dem in Tabelle 53 angegebenen Pipettierschema angesetzt und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss an die IVT wurde der Ansatz für 10 min bei 5,000 *g* zentrifugiert und der Pyrophosphat-Niederschlag entfernt. 1 mL Überstand wurde mit 335 μL MilliQ-H₂O, 150 μL 10x DNase I-Puffer und 15 μL DNase I (*ThermoFisher Scientific*, DNase I, RNase frei, 1 U/ μL) versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die RNA wurde durch Chloroform/Phenol-Extraktion isoliert (siehe 8.16.4) und gefällt (siehe 8.16.5).

Tabelle 53: Pipettierschema der IVT. (* 5x SB-Puffer = 200 mM Tris-HCl pH 8.1, 5 mM Spermidin, 25 mM DTT, 0.01% Triton-X 100 (v/v)).

Reagenz	Konzentration	Volumen [μL]
MilliQ-H ₂ O	---	24.5
<i>Template</i>	200 ng/ μL	10
NTP	100 mM	je 5
5x SB-Puffer*	---	20
DTT	100 mM	5
BSA	1 mg/mL	0.5
MgCl ₂	100 mM	10
T7-RNAP	1.7 μM	10

8.16.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Chloroform/Phenol-Extraktion wurde nach dem in Abbildung 110 dargestellten Schema durchgeführt. Dabei wurde ROTI®Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (*Carl Roth*, Karlsruhe,

Deutschland) verwendet. Vor dem Abtrennen der Phasen wurden die Ansätze für 3 min mittels Vortex durchmischt und anschließend 5 min an einer Tischzentrifuge zentrifugiert.

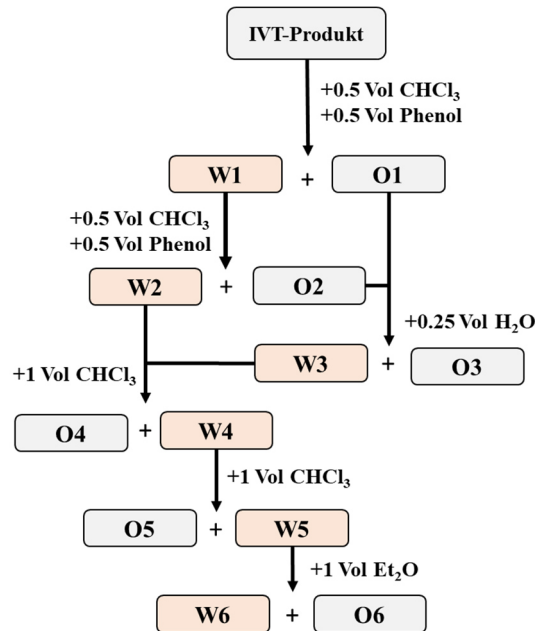


Abbildung 110: Schema der Chloroform/Phenol-Extraktionsschritte.

8.16.5 RNA-Fällung

Wässrige RNA-Lösung wurde mit 10 Vol% 1 M NaOAc oder NH_4OAc -Puffer (pH 5.0) versetzt. Anschließend wurden 3 Volumina absol. EtOH zugegeben, mittels Vortex durchmischt und das Gemisch für 1 h bei -80°C gelagert. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 13,000 g und -4°C für 1 h. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 200 μL 75%igem eiskaltem EtOH gewaschen und für 30 min bei 13,000 g und -4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt und das Pellet bei RT getrocknet.

8.16.6 Oxidation von RNA-Molekülen *via* Malprade-Reaktion

5 μL an RNA (100 μM) in 50 mM NaOAc-Puffer (pH 5.0) wurden mit 20 μL NaIO-Lösung (25 mM in MilliQ- H_2O) versetzt und 1 h bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Die Lösung wurde mit 2.5 μL 5 M NaOAc-Lösung (pH 5.0) und 75 μL absolutem Ethanol (eiskalt) versetzt und analog zu 8.16.5 gefällt. Das entstandene Pellet wurde nach dem Trocknen umgehend weiterverwendet.

8.16.7 Kopplung durch reduktive Aminierung

Die gefällte, oxidierte RNA wurde in PBS-Puffer (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 8.0) aufgenommen und auf 1 µM verdünnt. Anschließend wurde die Lösung mit 35 Vol% DMSO und 23 Vol% Amin-Lösung (4 mM in DMSO) versetzt. Das Gemisch wurde 20 min bei RT inkubiert und die reduktive Aminierung durch Zugabe von 10 Vol% einer frischen wässrigen NaBH₃CN-Lösung (250 mM; 25 mM Endkonzentration) gestartet. Die Reaktion wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und das Produkt anschließend gefällt.

8.16.8 RNase T1-Verdau

4 µL IVT-Produkt (11.2 µg/µL) wurden in 32 µL H₂O und 4 µL 10xRNase T1-Puffer (200 µM Tris pH 7.5, 8 µM EDTA) aufgenommen und mit 1 µL RNase T1 (100 U) versetzt. Die Lösung wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels LC-MS untersucht (siehe Tabelle 54).

Tabelle 54: Laufmittel und LC-MS-Programm zur Analyse des RNase T1-Verdau.

Laufmittel		t [min]	A [%]	B [%]	C [%]	Flussrate [mL/min]
A	H ₂ O	1	0	2	98	0.5
B	MeOH	20	0	30	70	0.5
C	200 mM HFIP, 8 mM TEA	30	0	100	0	0.5

8.16.9 PAGE-Gele

Tabelle 55: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und deren Vertreter für die denaturierenden PAGE-Gele.

Puffer	Zusammensetzung/Vertreiber
Acrylamid-Lösung	10% (v/v) 10x TBE-Puffer, 60% (v/v) PAGE <i>concentrate denaturing</i> (25%), 30% v/v PAGE <i>diluent denaturing</i>
Beladungs-Puffer	90% v/v Formamid, 10% v/v TBE 10x in Wasser
PAGE <i>concentrate denaturing</i> (25%)	Carl Roth
10x TBE-Puffer	Carl Roth
30% v/v PAGE <i>diluent denaturing</i>	Carl Roth

Zur Analyse von RNA-Konstrukten wurden 15%ige denaturierende PAGE-Gele verwendet (siehe Tabelle 55 und 47). Die RNA-Proben wurden 1 : 1 (v : v) mit Beladungs-Puffer versetzt und bei einer konstanten Leistung von 12 W für 1.5 – 2 h aufgetrennt. Die Gele wurden in verdünnter GelRed-Lösung (3x GelRed : TBE-Puffer = 1 : 2 (v : v)) für 20 min bei RT angefärbt. Anschließend wurde das Gel mit Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE)-Puffer gewaschen und umgehend an einem Typhoon TRIO+ (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) bei einer Wellenlänge von 526 nm gescannt (siehe Tabelle 56). Als Größenstandard wurde der Ultra low range DNA-Marker (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts) verwendet.

Tabelle 56: (links) Mischungsverhältnis zur Darstellung eines denaturierenden PAGE-Gels. (rechts) Anfärbereagenzien bzw. Farbstoffe und deren zugehörige Anregungs-/Detektionswellenlängen.

Puffer/Reagenz	Volumen	Färbereagenz/Dye	Anregung	Emissionsfilter
Gel-Lösung	100 mL	GelRed	532	610BP30
10%ige APS-Lösung	400 µL	Fluorescein	488	520BP40
TEMED	50 µL			

8.16.10 Allgemeine LC-MS-Methoden

LC-MS-basierte Untersuchungen von RNA-Proben wurden an einem HPLC-System der HP Agilent 1100 Serie (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) inklusive eines binären Pumpensystems mit Dioden-Array-Detektor und Autosampler durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte über eine YMC C18-Säule (150 x 3 mm, Microbore, S-3 µm, 12 nm) von Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA). Die Massenspektrometrie erfolgte durch eine nachgeschaltete *electrospray ionization-mass spectrometry* (ESI-MS) im negativen Modus innerhalb des Bereichs von Interesse. Die verwendeten Lösungsmittel bzw. Puffer und LC-MS-Protokolle sind in den nachfolgenden Tabellen 58 – 60 aufgelistet.

Tabelle 57: Lösungsmittel/Puffer und LC-MS-Protokolle zur Analyse des RNA-Oligomers 533.

Laufmittel	t [min]	A [%]	B [%]	C [%]	Flussrate [mL/min]
A H ₂ O	15	70	20	10	0.4
B ACN	17	40	50	10	0.4
C 1 M TEAA pH 8.0	20	40	50	10	0.4
	21	83	7	10	0.4

Tabelle 58: Lösungsmittel/Puffer und LC-MS-Protokolle zur Analyse der Kopplungsreaktion zwischen RNA-Oligomer 533 und Fluorescein-Derivat.

Laufmittel		t [min]	A [%]	B [%]	C [%]	Flussrate [mL/min]
A	H ₂ O	15	65	25	10	0.4
B	ACN	17	40	50	10	0.4
C	1 M TEAA pH 8.0	19	40	50	10	0.4
		21	83	7	10	0.4

Tabelle 59: Lösungsmittel/Puffer und LC-MS-Protokolle zur Analyse der Kopplungsreaktion zwischen RNA und Vinylsulfonen.

Laufmittel		t [min]	A [%]	B [%]	C [%]	Flussrate [mL/min]
A	H ₂ O	25	25	70	5	0.4
B	ACN	30	25	70	5	0.4
C	1 M TEAA pH 8.0	31	88	7	5	0.4
		32	88	7	5	0.4

8.17 Verwendete Plasmide und DNA-Konstrukte

Alle Rhodesain-Konstrukte, die in *E. coli* exprimiert wurden, wurden mit Hilfe eines pET-11a-Plasmiden (siehe Abbildung 111) in *E. coli* transformiert. Das Rhodesain-Gen befand sich dabei zwischen einer *NdeI*- und einer *BamHI*-Restriktionsschnittstelle *downstream* zu einem T7-RNA-Polymerase-Promotor.

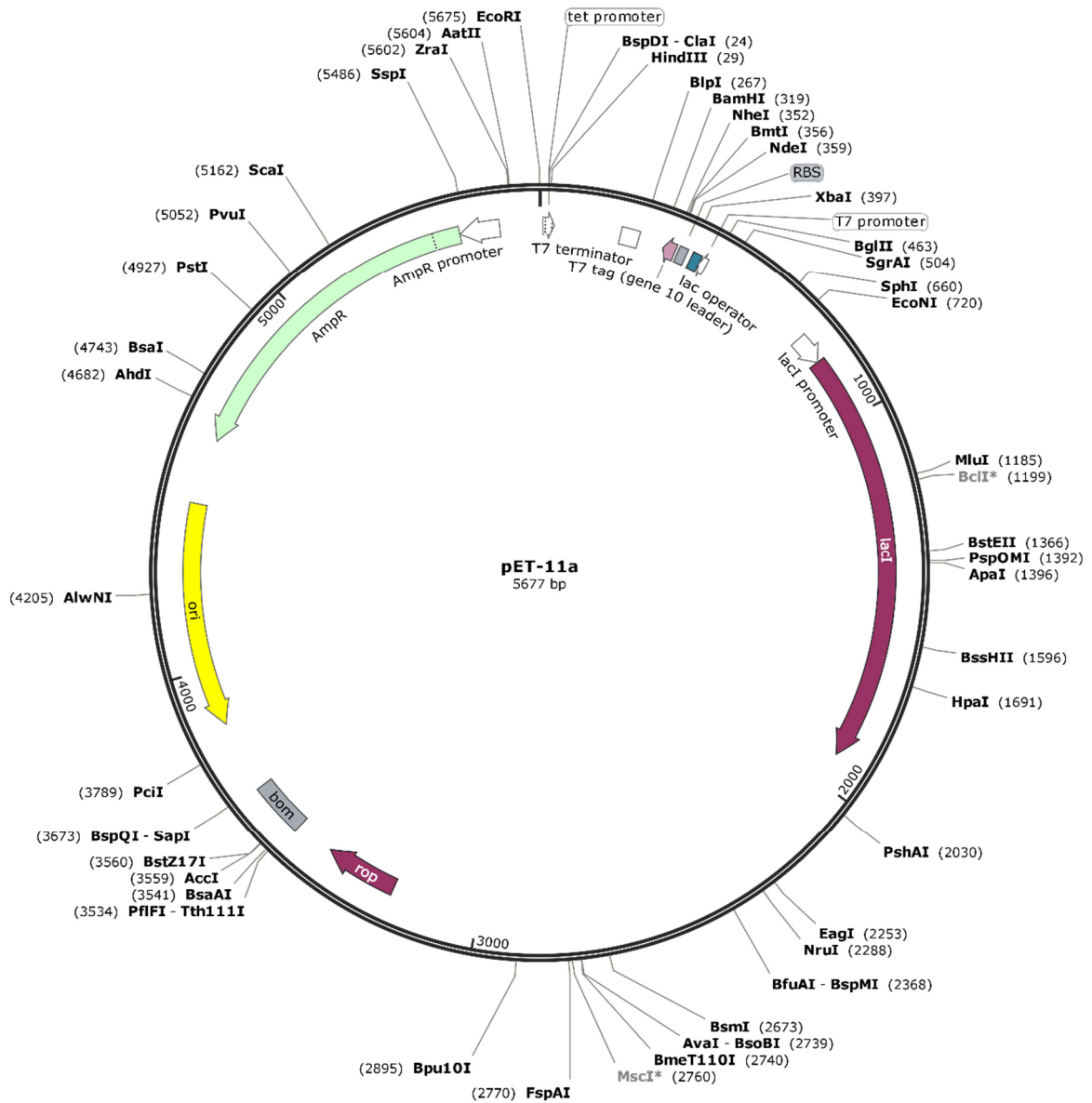


Abbildung 111: Plasmid-Karte von pET-11a.

DNA- und Aminosäuresequenz des Rhodesain-GFP-Gesamtkonstrukts

ATGGCTTGTCTAGCATCAGTAGCTCTAGGGAGTTACACGTTGAAGAATCACTAGAAATGCGTTTT
 M A C L A S V A L G S L H V E E S L E M R F
GCGGCGTTCAAGAAGAAATACGGTAAGGTGTACAAAACGCGAAGGAAGAGGCGTTCCGTTTTTCGT
 A A F K K K Y G K V Y K D A K E E A F R F R
GCGTTCGAGGAAAACATGGAGCAAGCGAAAATCCAAGCGGCGGCGAACCCGTATGCGACCTTCGGC
 A F E E N M E Q A K I Q A A A N P Y A T F G
GTTACCCCGTTTAGCGATATGACCCGTGAGGAATTCCTGCGCGTTACCGTAACGGTGCAGCTAT
 V T P F S D M T R E E F R A R Y R N G A S Y
TTTGGCGGCGGCGCAAAAACGTTCTGCGTAAGACCGTGAACGTTACCAACCGGTCGTGCGCCGGCGGGC
 F A A A Q K R L R K T V N V T T G R A P A A
 GTGGACTGGCGTGAAAAGGGTGGCGTGACCCCGTTAAGGATCAGGGCCAATGCGGTAGCTTGCTGG
 V D W R E K G A V T P V K D Q G Q C G S **C** W
 GCGTTCAGCACCATCGGCAACATTGAGGGCCAGTGGCAAGTGGCGGGCAACCCGCTGGTTAGCCTG
 A F S T I G N I E G Q W Q V A G N P L V S L
 AGCGAACAGATGCTGGTGAGCTGCGACACCATCGATTTTCGGTTGCGGTGGCGGTCTGATGGACAAC
 S E Q M L V S C D T I D F G C G G G L M D N
 GCGTTTAACTGGATTGTGAACAGCAACGGCGGTAACGTTTTTACCGAGGCGAGCTACCCGTATGTT
 A F N W I V N S R E G N V F T E A S Y P Y V
 AGCGGCAACGGCGAGCAGCCGCAATGCCAGATGAACGGCCACGAAATCGGTGCGGCGATTACCGAC
 S G N G E Q P Q C Q M N G H E I G A A I T D
 CACGTGGATCTGCCGAAGACGAGGATGCGATTGCGGCGTACCTGGCGGAAAACGGTCCGCTGGCG
 H V D L P Q D E D A I A A Y L A E N G P L A
 ATTGCGGTTGATGCGACCAGCTTTATGGATTATAACGGCGGTATTCTGACCAGCTGCACCAGCGAA
 I A V D A T S F M D Y N G G I L T S C T S E
 CAGCTGGACCACGGCGTGTGCTGGTTGGTTACAACGATGCGAGCAACCCGCCGTATTGGATCATT
 Q L D H G V L L V G Y N D A S N P P Y W I I
 AAAAACAGCTGGAGCAACATGTGGGGCGAGGATGGTTACATCCGTATTGAAAAGGGCACCAACCAA
 K N S W S N M W G E D G Y I R I E K G T N Q
 TGCCTGATGAACCAGGCGGTTAGCAGCGCGGTTGTTGGCGGCCCGGAGAATCTGTATTTTCAAGGT
 C L M N Q A V S S A V V G P E N L Y F Q **||**G
AGCGTGAGCAAGGCGAGGATGTTTACCAGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGAC
 S V S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D
GTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC
 V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T
CTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACC
 L K F I C T T G K L P V P W P T L V T T L T
TACGGCGTGAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCC
 Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S A
ATGCCCCAAGGTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGCGCAACTACAAGACCCCG
 M P E G Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R
GCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAG
 A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K
GAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTAACAGCCACAACGCTCTATATCATG
 E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M
GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC
 A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G S
GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
 V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D
AACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC
 N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V
CTGCTGGAGTTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGCACCACCAT
 L L E F V T A A G I T L G M D E L Y K H H H
CACCACCACTAA
 H H H ***

*** = Stopp

|| = TEV-Schnittstelle

Unterstrichen = PropeptidUnterstrichen = GFPUnterstrichen = Cys131

Die theoretischen molekularen Eigenschaften von Rhodesain und dessen Vorläuferproteinen wurden durch das Online-Tool *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>) berechnet und sind in Tabelle 60 aufgelistet.

Tabelle 60: Durch ProtParam berechnete Parameter von Rhodesain aus *E. coli*.

Eigenschaft	Pro-Rhodesain-GFP	Pro-Rhodesain	mature Rhodesain
Zahl der Aminosäuren	575	329	223
Molekulargewicht [Da]	63,660.38	35,901.13	23,843.35
Theoretischer pI	5.36	4.80	3.96
Extinktionskoeffizient [M-1 cm-1]	80,385	58,370	50,795

Rhodesain-Konstrukt zur heterologen Expression in *P. pastoris*

Rhodesain aus *P. pastoris* wurde mit Hilfe eines pPICZalphaB-Vektors in den *strain* X33 kloniert (Diss. [REDACTED]). Das exprimierte Rhodesain hatte dabei die folgende Sequenz. Die theoretischen molekularen Eigenschaften des Proteins wurden durch das Online-Tool *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>) berechnet und sind in Tabelle 61 aufgelistet.

DNA- und Aminosäuresequenz des Rhodesains für die Expression aus *P. pastoris*

M A C L A S V A L G S L H V E E S L E M R F
A A F K K K Y G K V Y K D A K E E A F R F R
A F E E N M E Q A K I Q A A A N P Y A T F G
V T P F S D M T R E E F R A R Y R N G A S Y
F A A A Q K R L R K T V N V T T G R A P A A
V D W R E K G A V T P V K D Q G Q C G S C W
A F S T I G N I E G Q W Q V A G N P L V S L
S E Q M L V S C D T I D F G C G G G L M D N
A F N W I V N S N G G N V F T E A S Y P Y V
S G N G E Q P Q C Q M N G H E I G A A I T D
H V D L P Q D E D A I A A Y L A E N G P L A
I A V D A T S F M D Y N G G I L T S C T S E
Q L D H G V L L V G Y N D A S N P P Y W I I
K N S W S N M W G E D G Y I R I E K G T N Q
C L M N Q A V S S A V V G G P

Tabelle 61: Durch ProtParam berechnete Parameter von WT-Rhodesain aus *P. pastoris*.

Eigenschaft	Proform	Aktive Form
Zahl der Aminosäuren	323	217
Molekulargewicht [Da]	35,106.27	23,084.48
Theoretischer pI	4.85	3.98
Extinktionskoeffizient [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]	56,880	49,305

Das Gen des GFP-Fusionsproteins, welches an Rhodesain fusioniert wurde, wurde aus einem pEGFP-C1-Vektor gewonnen. Die Plasmidkarte, sowie die Sequenz des EGFPs sind im Folgenden angegeben (siehe Abbildung 112). Das GFP-Gen befand sich zwischen einer *AgeI* und *HindIII*-Restriktionsschnittstelle.

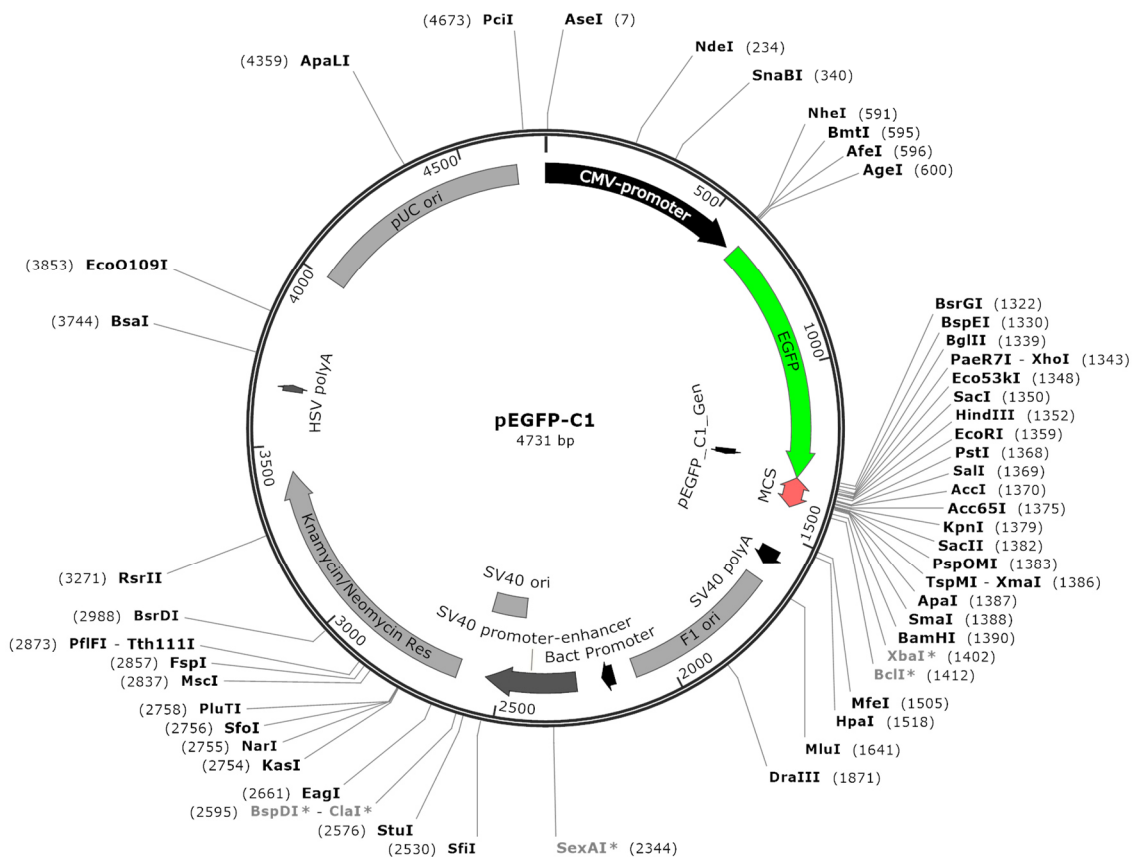


Abbildung 112: Plasmid-Karte des pEGFP-C1-Vektors.

DNA- und Aminosäuresequenz des GFPs

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCTGGTCGAGCTGGACGGCGAC
M V S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D
GTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC
V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T
CTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACC
L K F I C T T G K L P V P W P T L V T T L T
TACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCC
Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S A
ATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGC
M P E G Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R
GCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAG
A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K
GAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAACAGCCACAACGTCTATATCATG
E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M
GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC
A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G S
GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D
AACCCTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC
N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V
CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG
L L E F V T A A G I T L G M D E L Y K

T7-RNA-Polymerase

Die T7-RNAP sowie die Y639F-Mutante wurden mittels eines pQE-80-Plasmiden (siehe Abbildung 113) in *E. coli* transformiert und exprimiert. Der Plasmid wurde über *Addgene* erworben (pQE-80-T7WT, *Addgene*, Watertown, Massachusetts, USA, <https://www.addgene.org/102790/>). Das T7-RNAP-Gen befand sich zwischen einer *Bam*HI- und einer *Hind*III-Restriktionsschnittstelle. Die theoretischen molekularen Eigenschaften des Proteins wurden durch das Online-Tool *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>) berechnet und sind in Tabelle 62 aufgelistet.

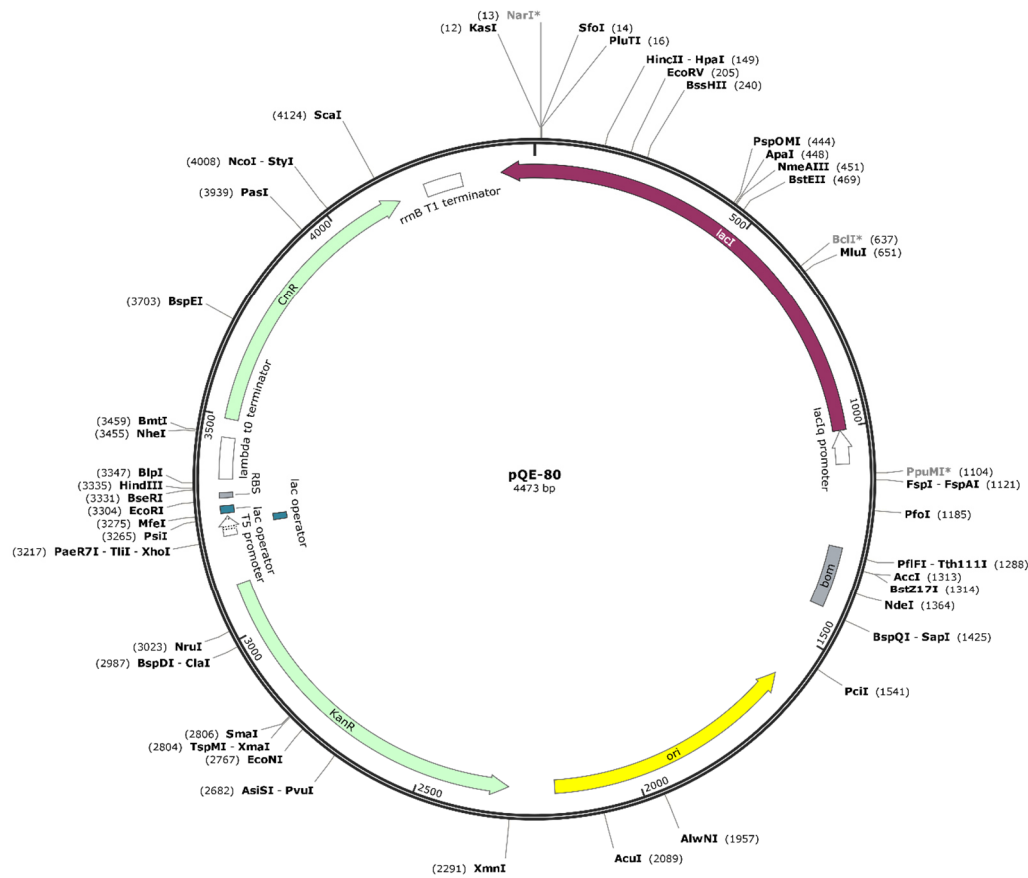


Abbildung 113: Plasmid-Karte des pQE-80-Vektors.

DNA- und Aminosäuresequenz des T7-RNAP

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCAACACGATTAACATCGCTAAGAACGACTTC
 M R G S H H H H H H G S N T I N I A K N D F
 TCTGACATCGAACTGGCTGTATCCCCTTCAACTCTGGCTGACCATTACGGTGAGCGTTTAGCT
 S D I E L A A I P F N T L A D H Y G E R L A
 CGCGAACAGTTGGCCCTTGAGCATGAGTCTTACGAGATGGGTGAAGCAGCTTCCGCAAGATGTTT
 R E Q L A L E H E S Y E M G E A R F R K M F
 GAGCGTCAACTTAAAGCTGGTGAGGTTGCGGATAACGCTGCCGCAAGCCTCTCATCACTACCCTA
 E R Q L K A G E V A D N A A A K P L I T T L
 CTCCTAAGATGATTGCACGCATCAACGACTGGTTTGGGAAAGTAAAGCTAAGCGCGCAAGCGC
 L P K M I A R I N D W F E E V K A K R G K R
 CCGACAGCCTTCCAGTTCCTGCAAGAAATCAAGCCGGAAGCCGTAGCGTACATCACCATTAAGACC
 P T A F Q F L Q E I K P E A V A Y I T I K T
 ACTCTGGCTTGCTAACCAGTGCTGACAATAACAACCGTTCAGGCTGTAGCAAGCGCAATCGGTCCG
 T L A C L T S A D N T T V Q A V A S A I G R
 GCCATTGAGACGAGGCTCGCTTCGGTTCGATCCGTGACCTGAAGCTAAGCACTTCAAGAAAAAC
 A I E D E A R F G R I R D L E A K H F K K N
 GTTGAGGAACAACCAAGCGCGTAGGGCACGTCTACAAGAAAGCATTTATGCAAGTTGTGCGAG
 V E E Q L N K R V G H V Y K K A F M Q V V E
 GCTGACATGCTCTAAGGGTCTACTCGGTGGCGAGGCGTGGTCTTCGTGGCATAAGGAAGACTCT
 A D M L S K G L L G G E A W S S W H K E D S
 ATTCATGTAGGAGTACGTCATCGAGATGCTCATTGAGTCAACCGGAATGGTTAGCTTACACCGC
 I H V G V R C I E M L I E S T G M V S L H R
 CAAAATGCTGGCGTAGTAGTCAAGACTCTGAGACTATCGAACTCGCACCTGAATACGCTGAGGCT
 Q N A G V V G Q D S E T I E L A P E Y A E A
 ATCGCAACCCGTGCAGGTGCGCTGGCTGGCATCTCTCCGATGTTCCAACCTTGGCTAGTTCCTCTCT
 I A T R A G A L A G I S P M F Q P C V V P P
 AAGCCGTGGACTGGCATTACTGGTGGTGGCTATTGGGCTAACGGTCGTGCTCTGCGCGTGGTG
 K P W T G I T G G G Y W A N G R R P L A L V
 CGTACTCACAGTAAGAAAGCACTGATGCGCTACGAAGACGTTTACATGCCTGAGGTGTACAAAGCG
 R T H S K K A L M R Y E D V Y M P E V Y K A
 ATTAACATTGCGCAAAACACCGCATGGAAAATCAACAAGAAAGTCTTAGCGGTGCGCAACGTAATC
 I N I A Q N T A G C I N K I N K K V L A V A N V I
 ACCAAGTGAAGCATGTTCCGGTACGAGGACATCCCTGCGATTGAGCGTGAAGAACTCCCGATGAAA
 T K W K H C P V E D I P A I E R E E L P M K
 CCGGAAGACATCGACATGAATCCTGAGGCTCTCACCGCGTGGAAACGTGCTGCCGCTGCTGTGTAC
 P E D I D M N P E A L T A W K R A A A A V Y
 CGCAAGGACAAGGCTCGCAAGTCTCGCCGTATCAGCCTTGAGTTCATGCTTGAGCAAGCCAATAAG
 R K D K A R K S R R I S L E F M L E Q A N K
 TTTGCTAACCATAAGGCCATCTGGTTCCTTACAACATGGACTGGCGCGGTGCTGTTTACGCTGTG
 F A N H K A I W F P Y N M D W R G R V Y A V
 TCAATGTTCAACCCGCAAGGTAACGATATGACCAAAGGACTGCTTACGCTGGCGAAAGGTAACCA
 S M F N P Q G N D M T K G L L T L A K G K P
 ATCGGTAAGGAAGGTTACTACTGGCTGAAAATCCACGGTGCAAACTGTGCGGGTGTGATAAGGTT
 I G K E G C Y Y W L L K I H G A N C A G V D K V
 CCGTTCCTGAGCGATCAAGTTCATTGAGGAAAACACGAGAACATCATGGCTTGCAGTAAAGTCT
 P F P E R I K F I E E N H E N I M A C A K S
 CCACTGGAGAACAACCTGGTGGGCTGAGCAAGATTCTCCGTTCCTTGCATTCTGCTTTGAG
 P L E N T W W A E Q D S P F C F L A F C F E
 TACGCTGGGGTACAGCACCAGGCCTGAGCTATAACTGCTCCCTCCGCTGGCGTTTGACGGGTCT
 Y A G V Q H H G L S Y N C S L P L A F D G S
 TGCTCTGGCATCCAGCACTTCTCCGCGATGCTCCGAGATGAGGTAGGTGGTCGCGCGGTTAACTTG
 C S G I Q H F S A M L R D E V G G R A V N L
 CTTCTAGTGAAAACCGTTCAGGACATCTACGGGATTGTTGCTAAGAAAGTCAACGAGATTCTACAA
 L P S E T V Q D I Y G I V A K K V N E I L Q
 GCAGACCAATCAATGGGACCGATAACGAAGTAGTTACCGTGACCGATGAGAACACTGGTGAAATC
 A D A I N G T A D N E V V T V T D E N T G E I
 TCTGAGAAAAGTCAAGCTGGGCACTAAGGCACTGGCTGGTCAATGGCTGGCTTACGGTGTACTCGC
 S E K V K L G T K A L A G Q W L A Y G V T R
 AGTGTGACTAAGCGTTCAGTCATGACGCTGGCTTACGGGTCCAAAGAGTTCGGCTTCCGTCAACAA
 S V T K R S V M T L A Y G S K E F G F R Q Q
 GTGCTGGAAGATAACCATTACGCCAGCTATTGATTCCGGCAAGGGTCTGATGTTCACTCAGCCGAAT
 V L E D T I Q P A I D S G K G L M F T Q P N

CAGGCTGCTGGATACATGGCTAAGCTGATTTGGGAATCTGTGAGCGTGACGGTGGTAGCTGCGGTT
 Q A A G Y M A K L I W E S V S V T V V A A V
 GAAGCAATGAACTGGCTTAAGTCTGCTGCTAAGCTGCTGGCTGCTGAGGTCAAAGATAAGAAGACT
 E A M N W L K S A A K L L A A E V K D K K T
 GGAGAGATTCTTCGCAAGCGTTGCGCTGTGCATGGGTAACCTCTGATGGTTCCCTGTGTGGCAG
 G E I L R K R C A V H W V T P D G F P V W Q
 GAATACAAGAAGCCTATTCAGACGCGCTTGAACCTGATGTTCCCTCGGTCAGTTCGCTTACAGCCT
 E Y K K P I Q T R L N L M F L G Q F R L Q P
 ACCATTAACACCAACAAAGATAGCGAGATTGATGCACACAAACAGGAGTCTGGTATCGCTCCTAAC
 T I N T N K D S E I D A H K Q E S G I A P N
 TTTGTACACAGCAAGACGGTAGCCACCTTCGTAAGACTGTAGTGTGGGCACACGAGAAGTACGGA
 F V H S Q D G S H L R K T V V W A H E K Y G
 ATCGAATCTTTGCACTGATTACGACTCCTTCGGTACCATTCCGGCTGACGCTGCGAACCTGTTC
 I E S F A L I H D S F G T I P A D A A N L F
 AAAGCAGTGCAGAACTATGGTTGACACATATGAGTCTTGTGATGTACTGGCTGATTTCTACGAC
 K A V R E T M V D T Y E S C D V L A D F Y D
 CAGTTCGCTGACCAGTTGCACGAGTCTCAATTGGACAAAATGCCAGCACTTCCGGCTAAAGGTAAC
 Q F A D Q L H E S Q L D K M P A L P A K G N
 TTGAACCTCCGTGACATCTTAGAGTCGGACTTCGCGTTTCGCGTAA
 L N L R D I L E S D F A F A ***

Tabelle 62: Durch ProtParam berechnete molekulare Eigenschaften der T7-RNAP.

Eigenschaft	Wert
Zahl der Aminosäuren	894
Molekulargewicht [Da]	100,122.52
Theoretischer pI	7.00
Extinktionskoeffizient [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]	141,010.45

8.18 Mutanten und Klonierungsmethoden

8.18.1 Site directed mutagenesis

Mutationen bis hin zu 3 Basenpaaren wurden mittels *site directed mutagenesis* gezielt in Plasmide eingeführt. Dazu wurden während einer PCR Primer verwendet, welche die gewünschten Abweichung beinhalteten. Die Primer wurden über *Biomers* (Ulm, Deutschland) oder *IDT (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA)* erworben und nach den folgenden Kriterien ausgewählt:

- Für die beiden komplementären DNA-Stränge wurde jeweils ein Primer verwendet
- Die Länge der Primer wurde auf 25 – 30 Basen begrenzt
- Jeder Primer besaß mindestens eine G- oder C-Base am 3'-Terminus
- Die gewünschte *missmatch* befand sich in der Nähe des 3'-Terminus
- Beide Primer *alignen* mit 14 – 18 Basenpaaren
- Die Schmelztemperatur von DNA-*template* und Primer lag 70 – 78 °C
- Die Schmelztemperatur wurde nach Formel (16) berechnet:

$$T_m = (81.5 + 0.41 * \%G/C - (675/N) - (\% \text{ missmatch}))^\circ\text{C} \quad (16)$$

Die Mutagenese wurde unter Verwendung der KAPA-Polymerase (KAPA HiFi HotStart PCR Kit, *Roche*, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die Annealing-Temperatur X im PCR-Programm wurde entsprechend der berechneten Schmelzpunkte angepasst (siehe Tabelle 63). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 64 und Tabelle 65 angegeben. Nach vollständiger PCR wurden 21 µL des Ansatzes mit 23.5 µL H₂O, 5 µL NEBuffer 4 (*New England Biolabs*, Frankfurt) und 1 µL DpnI (*New England Biolabs*, Frankfurt, Deutschland) versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Nuklease wurden für 20 min bei 80 °C inaktiviert und 10 µL des Ansatzes wurden in DH5α- oder XL10-Gold-Zellen transformiert (siehe 8.7.2).

Tabelle 63: Pipettierschema und PCR-Programm der durchgeführten site directed mutagenesis. Die Annealing-Temperatur X wurden an die verwendeten Primer angepasst. Diese sind in Tabelle 65 aufgelistet.

Volumen [µL]	Reagenz	Temperatur [°C]	Zeit	
14.75	H ₂ O	95	3 min	x 30
5	5x HIFI-Puffer	98	20 s	
1.5	Primer 1	X	15 s	
1.5	Primer 2	72	60 s/1 kbp	
1	Template (100 ng/mL)	72	120 s/1 kbp	
0.75	dNTP-Mix			
0.5	KAPA-Polymerase			

Tabelle 64: Verwendete Primer für site directed mutagenesis von *Rhodesain*-Konstrukten.

Mutagenese	Primer	Annealing-T. [°C]
Q127W	5'-CAGGGCTGGTGC GG TAGCTGCTGGGCGTTCAG-3' 5'-CCGCACCAGCCCTGATCCTTAACCGGGGTCAC-3'	65
F167W	5'-CATCGATTGGGGTTGCGGTGGCGGTCTGATG-3' 5'-CAACCCCAATCGATGGTGTGCGAGCTCACC-3'	70
Q265W	5'-CAGCGAATGGCTGGACCACGGCGTGCTGCTG-3' 5'-GTCCAGCCATTCGCTGGTGCAGCTGGTCAG-3'	70
C131A	5'-GCGGTAGCGCGTGGGCGTTCAGCACC-3' 5'-CGCCACGCGCTACCGCATTGGCCCTG-3'	70
C3S	5'-GGCTAGCCTAGCATCAGTAGCTCTAGGGAG-3' 5'-CTGATGCTAGGCTAGCCATATGTATATCTCCTTC-3'	64 (1min <i>Annealing</i> , Ramp.: 0.3 °C/min)
A80C	5'-GAATTCCGTTGCCGTTACCGTAACGGTGCG-3' 5'-GTAACGGCAACGGAATTCCTCACGGGTCATATCGC-3'	72
V32C	5'-CGGTAAGTGCTACAAAGACGCGAAGGAAGAGG-3' 5'-CTTTGTAGCACTTACCGTATTTCTTCTTGAACGCCG-3'	72
Q127W (falls C131A-Mutation vorhanden)	5'-GATCAGGGCTGGTGC GG TAGCTGCTGGG-3' 5'-CGCACCAGCCCTGATCCTTAACCGGG-3'	69
S87C	5'-CGGTGCGTGCTATTTGCGGCGG-3' 5'-AATAGCACGCACCGTTACGGTAACGC-3'	72
E237A	5'-CTGGCGGCGAACGGTCCGCTGGC-3' 5'-GACCGTTCGCCGCCAGGTACGCCGC-3'	72
S279C	5'-GATGCGTGCAACCCGCCGTATTGGATC-3' 5'-CGGGTTGCACGCATCGTTGTAACCAAC-3'	70
D223N	5'-CCACGTGAACCTGCCGCAAGACGAGGATGC-3' 5'-CGGCAGTTGCACGTGGTCCGTAATCGCCG-3'	64 (1min <i>Annealing</i> , Ramp.: 0.3 °C/min)
D175N	5'-CGGTCTGATGAACAACGCGTTTAACTGG-3' 5'-GTTGTTTCATCAGACCGCCACCGCAAC-3'	64 (1min <i>Annealing</i> , Ramp.: 0.3 °C/min)

Tabelle 65: Primer der site directed mutagenesis der T7-RNAP.

Mutagenese	Primer	Annealing-T. [°C]
Y639F	5'-CGCTGGCTTTCGGGTCCAAAGAGTTCG-3' 5'-GACCCGAAAGCCAGCGTCATGACTGAAC-3'	65

Für das simultane Einführen mehrerer Mutationen wurde das *QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis-Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die dafür verwendeten Primer sind in Tabelle 66 aufgelistet.

Tabelle 66: Primer für die simultane Einführung mehrerer Mutationen durch das QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis-Kit.

Mutagenese	Primer	Annealing-T. [°C]
D175R	5'-CGGTGGCGGTCTGATGAACAACGCGTTTAACTG-3'	65
D223R	5'-GATTACCGACCACGTGAACCTGCCGCAAGACGAGG-3'	65

8.18.2 Gibson-assembly

Tabelle 67: Puffer und Zusammensetzungen des Gibson-assemblys

Puffer	Zusammensetzung
5x Isothermales Reaktionsgemisch	500 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM MgCl ₂ , 1 mM dNTP-Mix, 50 mM DTT, 0.25 g/mL PEG-8000, 50 mM NAD ⁺
Gibson <i>Assembly Master Mix</i>	320 µL 5x Isothermales Reaktionsgemisch, 0.64 µL T5-Exonuklease (10 U/µL), 20 µL Phusion DNA-Polymerase (2 U/µL), 0.16 µL Taq DNA-Ligase (40 U/µL), 860 µL MilliQ-H ₂ O

Längere DNA-Fragmente wurden mittels Gibson-assembly in Plasmide eingefügt. Die dafür notwendigen linearisierten Fragmente wurden analog zu 8.18.1 mittels PCR amplifiziert und nach Dpn I-Verdau mittels des PCR-clean-up-Kit (GeneJet PCR purification Kit, Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland) aufgereinigt. Anschließend wurden die Konstrukte in identischen Molalitäten zu 5 µL Gesamtvolumen vereinigt. Das Gemisch wurde mit 15 µL Gibson-Master-Mix versetzt, welcher zuvor 5 min bei 50 °C aktiviert wurde, und für 1 h bei 48 °C inkubiert. 10 µL Ansatz wurden umgehend in DH5α- oder XL10-Gold Zellen transformiert (siehe 8.7.2). Die verwendeten PCR-Primer sind in Tabelle 68 aufgelistet.

Tabelle 68: Primer zur Darstellung der linearisierten DNA-Fragmente für den Gibson-assembly, sowie die verwendeten Plasmid-templates.

Linearisierte DNA	Primer 5' – 3'	Template	T _m [°C]
Vektor-Rückgrat	5'-GCTACCTTGAAAATACAGATTCTCCGGG-3'	pET-11a-Rhod-TEV-6xHis	72
	5'-CACCACCATCACCACCACTAAGG-3'		
GFP-insert	5'-GGTGGTGATGGTGGTGCTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3'	pEGFP-C1	65
	5'-CTGTATTTTCAAGGTAGCGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-3'		

8.18.3 Sequenzierung

Klonierte Konstrukte wurden von der Firma *StarSEQ* (Mainz, Deutschland) sequenziert. Dazu wurden 400 – 700 ng Plasmid-DNA in 6 µL Gesamtvolumen mit 1 µL eines 10 µM Sequenzierungsprimers versetzt (siehe Tabelle 69). Die Auswertung erfolgte durch Abgleich der Sequenzen in dem Programm *SnapGene* (Version 5.9.5).

Tabelle 69: Auflistung der verwendeten Sequenzierungsprimer, sowie der zugehörigen Plasmide.

Seq.-Primer	Primer 5'—3'	Template
T7-Promotor	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	pET-11a
T7-Terminator	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	pET-11a
T7-RNAP_1	5'-ACGAGGCCCTTTCGTCTTCAC-3'	pQE-80-T7-RNAP
T7-RNAP_2	5'-CGTTGAGGAACAACCAAGC-3'	pQE-80-T7-RNAP
T7-RNAP_3	5'-CTGTGTACCGCAAGGACAAGG-3'	pQE-80-T7-RNAP
T7-RNAP_4	5'-TCAAGCTGGGCACTAAGGCA-3'	pQE-80-T7-RNAP
Rhod.-GFP-for.	5'-TTTATGGATTATAACGGCGG-3'	pET-11a-Rhod-GFP
Rhod.-GFP-back.	5'-AAAATGGTACGTTCCCTGC-3'	pET-11a-Rhod-GFP

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der Human African Trypanosomiasis (HAT) in zwei Phasen und deren Symptome.	1
Abbildung 2: Struktur von K11777	2
Abbildung 3: Schematische Darstellung des <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Endo- und Exozytosekreislaufs in <i>T. brucei</i>	6
Abbildung 5: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen (humanpathogenen) Hydrolyseprozesse, an denen Rhodesain beteiligt ist.	7
Abbildung 6: Abfolge unterschiedlicher Domänen in (Pro-)Rhodesain.	9
Abbildung 7: Reifungsprozess von Zymogenen lysosomaler Proteasen zu aktiven Enzymen während der Translokation vom endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Lysosom.	10
Abbildung 8: Charakteristische Struktur motive und Orientierung der Pro-Domänen von CathL-ähnlichen Proteasen am Beispiel von Pro-Papain (PDB-ID.: 3TNX).	12
Abbildung 9: Typische Struktur motive der Cathepsin L-Zymogene am Beispiel der Kristallstruktur von Pro-Papain (PDB-ID.: 3TNX).	14
Abbildung 10: Reaktionsschritte der durch Cysteinproteasen katalysierten Peptidspaltung.	15
Abbildung 11: Aufteilung der katalytischen Domäne von CathL-Proteasen.	16
Abbildung 12: Nomenklatur der Substratseitenketten und deren Bindungsstellen in Proteasen nach Berger und Schechter.	16
Abbildung 13: Ausschnitt der Kristallstruktur des Rhodesain-K11777-Komplexes (PDB-ID.: 2P7U)...	17
Abbildung 14: Überlagerung der Kristallstrukturen der katalytischen Domänen von Rhodesain (Orange, PDB-ID.: 2P7U) und humanen Cathepsin L (Grau, PDB-ID.: 2YJ8), sowie deren Sequenz-Identitäten und Similaritäten.	18
Abbildung 15: Zeitachse der Entwicklung kovalenter Inhibitoren.	19
Abbildung 16: Theoretisches Energieprofil der Bindung eines kovalent (ir)reversiblen Inhibitors an eine Zielstruktur in einem vereinfachten zweistufigen Mechanismus.	21
Abbildung 17: Reaktionsmechanismen der Säure- und Base-katalysierten Hydrolyse des RNA-Rückgrats.	23
Abbildung 18: Beispiele von Derivatisierungen, welche zur Stabilisierung der RNA gegenüber Degradation eingesetzt werden.	24
Abbildung 19: Strukturformel von Pegaptanib.	24
Abbildung 20: Schematische Darstellung des SELEX-Zyklus.	25
Abbildung 21: Heterologe Expression von Rhodesain in <i>P. pastoris</i>	30
Abbildung 22: Aufreinigung von Rhodesain aus <i>P. pastoris</i>	31
Abbildung 23: NMR-basierte Studie der Bindung eines Nitroalken-basierten Inhibitors an Rhodesain. (links) Nitroalken-basierter Inhibitor.	32
Abbildung 24: Aufbau des Rhodesain-Konstrukts zur heterologen Expression von Rhodesain in <i>E. coli</i>	33
Abbildung 25: Analyse der Expressions- und Aufreinigungsversuche von Rhodesain aus <i>E. coli</i> mittels SDS-PAGE und Western-Blot.	33
Abbildung 26: Aufbau des Rhodesain-GFP-Konstrukts. Die un favorisierten CCC-Codons innerhalb des GFP-Gens sind in Rot eingezeichnet.	34

Abbildung 27: SDS-PAGE-Gele der IMAC- und TEV-Hydrolyse-Schritte während der Rhodessain-Aufreinigung.....	35
Abbildung 28: Autoaktivierung von Pro-Rhodessain.....	36
Abbildung 29: SEC-Lauf und das zugehörige SDS-PAGE-Gel von aktiviertem Rhodessain.....	36
Abbildung 30: Aufreinigung von inaktivem Pro-Rhodessain-C131A-Mutanten.....	37
Abbildung 31: Vergleich der heterolog exprimierten mature Rhodessain-Konstrukte aus <i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i>	37
Abbildung 32: Auswirkung der Proteinkonzentration auf die Kristallisation von Pro-Rhodessain-C131.....	39
Abbildung 33: Kristallstruktur von Pro-Rhodessain-C131A.....	41
Abbildung 34: Elektronendichtekarte der Kristallstruktur von Pro-Rhodessain-C131A und ausgewählter Elemente innerhalb der katalytischen Domäne.....	42
Abbildung 35: B-Faktoren der Pro-Rhodessain-Struktur.....	43
Abbildung 36: Interaktionen der Aminosäureseitenketten innerhalb des Propeptids von Pro-Rhodessain.....	44
Abbildung 37: Backbone-Interaktionen des β -sheets (Cyan) zwischen der Pro-Domäne und dem propeptide binding loop (PBL , Grau) der katalytischen Domäne, sowie die Wechselwirkung zwischen ProArg97 und Leu224 bzw. Val315.....	45
Abbildung 38: Vergleich zwischen Pro-Rhodessain und unterschiedlichen Zymogenen der CathL-Familie im Bereich der blocking peptide.....	46
Abbildung 39: Elektronendichtekarten entlang der Helix 4 (H4) von Pro-Rhodessain bei unterschiedlichen Sigma-Leveln aus verschiedenen Perspektiven.....	47
Abbildung 40: Kristallkontakte zwischen Helix 4 und anderen Protein-Monomeren.....	48
Abbildung 41: CD-Spektroskopie der TFE-Titrations von humanen und trypanosomalen blocking peptide.....	49
Abbildung 42: Ausschnitt des Alignments der Rhodessain-Pro-Domäne mit den AS-Sequenzen von Pro-Cathepsinen.....	50
Abbildung 43: Orientierung der Helix 4 und Peptidsubstraten hinsichtlich der N- und C-Termini innerhalb des active site clefts der Cathepsin L-Proteasen.....	51
Abbildung 44: Vergleich der Bindung von Helix 4 und dem Inhibitor K11777 an die katalytische Domäne von Rhodessain im Bereich der Substratbindetasche.....	51
Abbildung 45: Untersuchung eines potenziellen trans-cleavage-Prozesses während der Autoaktivierung von Pro-Rhodessain.....	53
Abbildung 46: Hypothetischer Mechanismus der Aktivierung von Pro-Rhodessain.....	54
Abbildung 47: Darstellung des PET-Systems zur Untersuchung eines pH-abhängigen binären Gleichgewichts zweier Pro-Rhodessain-Konformationen.....	55
Abbildung 48: Vergleich zwischen unterschiedlichen inaktiven Pro-Rhodessain-C131A-Mutanten, welche für PET-FCS-Experimente genutzt wurden.....	56
Abbildung 49: Fluoreszenzspektren der Farbstoff-markierten Pro-Rhodessain-Mutanten bei verschiedenen pH-Werten.....	56
Abbildung 50: CD-Spektroskopie von Pro-Rhodessain-C131A zur Untersuchung einer möglichen pH-induzierten Strukturänderung.....	57
Abbildung 51: PET-FCS-Messungen von Pro-Rhodessain unter aziden und basischen Bedingungen bei 37 °C.....	58
Abbildung 52: C α -RMSD-Werte der Pro-Rhodessain-Struktur in Bezug zur Ausgangsstruktur während der vier MD-Simulationen.....	60

Abbildung 53: Die $C\alpha$ -RMSD- und $C\alpha$ -RMSF-Plots der MD-Simulationen zur Identifizierung der dynamischsten Bereiche des Pro-Rhodesains.	61
Abbildung 54: Orientierung der AS-Seitenketten von <i>Pro</i> Arg95, <i>Pro</i> Arg97, Asp175 und Asp223 in der Kristallstruktur sowie während des letzten frames der MD-Simulation 4 nd und 8 ^{1st}	63
Abbildung 55: Sequenz- und Struktur-alignment von Pro-Rhodesain mit anderen CathL-Zymogenen.	65
Abbildung 56: Die Wechselwirkung zwischen <i>Pro</i> Glu76 und <i>Pro</i> Arg83 zeigt in den MD-Simulationen von Pro-Rhodesain ein pH-sensitives Verhalten.	66
Abbildung 57: Charakteristische WW innerhalb des Propeptids der CathL-Familie bleiben auch in Simulationen bei pH 4 erhalten.	67
Abbildung 58: Strukturformeln einer Carboxylat-, einer Carbonsäure- und einer Amidgruppe.	68
Abbildung 59: Wechselwirkungen zwischen <i>Pro</i> Arg106 und Glu237 in der Pro-Rhodesain-Struktur während des letzten frames der pH 8 nd MD-Simulation und des letzten frames der pH 4 ^{1st} MD-Simulation sowie in der Kristallstruktur.	69
Abbildung 60: Gel-shift-Assays zur Untersuchung der Einflüsse ausgewählter Mutanten auf den trans-cleavage-Prozess.	70
Abbildung 61: Vergleich der Prozessierungen von inaktiven Pro-Rhodesain-Mutanten bei unterschiedlichen pH-Werten.	71
Abbildung 62: Analyse des Einflusses der D175N-D223N-Doppelmutation auf die Autoaktivierung von Rhodensain mittels fluoreszenzbasiertem Enzymassay.	72
Abbildung 63: Sequenz des blocking peptide von Rhodensain sowie die identifizierten Hydrolysestellen durch Rhodensain. Die potenziellen Hydrolysestellen sind durch rote Abtrennungen gekennzeichnet.	73
Abbildung 64: Distanzen zwischen katalytischen Cystein 131 und den Hydrolysestellen innerhalb des blocking peptide in der Kristallstruktur von Pro-Rhodesain.	74
Abbildung 65: Darstellung der Rhodensain-S279C-Mutante, die für Rhodensain-Markierungen verwendet wurde. Die Positionen der active site und der S279C-Mutation (Cyan) wurden hervorgehoben.	80
Abbildung 66: Resultate des Mal-PEG-Assays der Markierung von Rhodensain-C3S-S279C.	81
Abbildung 67: Markierung des Pro-Rhodesain-S279C-GFP mit Cy5.	82
Abbildung 68: Immobilisierung von Biotin-markiertem Rhodensain-S279C auf der SPR-Chip-Oberfläche.	84
Abbildung 69: Strukturformeln der Verbindungen 2 und 16	85
Abbildung 70: Sensorgramme der SPR-Experimente zur Bindung von Verb. 2 an Rhodensain.	85
Abbildung 71: Überprüfung der katalytischen Aktivität von immobilisiertem Rhodensain auf einen SPR-Chip durch Umsetzung des Z-Phe-Arg-AMC-Substrats.	86
Abbildung 72: MST-Messung der Bindung von Inhibitor 2 an Cy5-markiertes Rhodensain.	87
Abbildung 73: Thermodynamische Profile der Bindung der Vinylsulfon-basierten Inhibitoren 1 und 2 an Rhodensain.	90
Abbildung 74: Strukturformeln der Verbindungen 3 und 4	90
Abbildung 75: Grundgerüst der Piperazin- (Blau) und Pyridin-substituierten (Rot) Inhibitorreihe.	91
Abbildung 76: Untersuchung der Bindung von (α -Fluoro-)Vinylsulfonen an Rhodensain auf Protonentransfer mittels ITC.	91
Abbildung 77: Strukturformeln der Inhibitoren 5 und 6	92
Abbildung 78: Thermodynamisches Profil der Bindung der Vinylsulfon-basierten Inhibitoren 1 und 2 sowie ihrer PEGylierten Analoga 5 und 6 an Rhodensain aus ITC-Messungen.	93

Abbildung 79: Schematische Darstellung der klassischen ITC-Auswertung und der kinITC ETC-Methode.....	95
Abbildung 80: Prinzip der inversen SPR-Messung.....	96
Abbildung 81: Validierung unterschiedlicher Rhodessain-Mutanten für PET-FCS-Messungen.....	99
Abbildung 82: Vergleich der Rhodessain-Q127W-Mutante mit WT-Rhodessain.....	99
Abbildung 83: PET-FCS-Spektren des Atto-markierten, irreversiblen Inhibitors (A , 8) und des reversiblen Inhibitors (B , 9) in Ab- (Grau) und in Anwesenheit von Rhodessain-Q127W (Orange).....	100
Abbildung 84: MD-Simulationen zur Untersuchung des Atto-VS/Rhodessain-Q127W-Systems.....	102
Abbildung 85: Auswertung der zweiten, konventionellen MD-Simulationen von kovalent gebundenem Atto-VS, sowie kovalent und nicht-kovalent gebundenem Atto- α -Fluoro-Vinylsulfon.....	103
Abbildung 86: Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationskonstanten unter Verwendung des Atto-VS/Rhodessain-Q127W-Systems.....	104
Abbildung 87: Reaktionsabfolge zur Kopplung von Inhibitoren oder anderen small molecules an RNA.....	109
Abbildung 88: Strukturformel des Fluorescein-Derivats, welches zur Etablierung der Kopplungsreaktion genutzt wurde.....	110
Abbildung 89: 15%iges denaturierendes PAGE-Gel der einzelnen Kopplungsschritte von Fluorescein an die RNA 533.....	110
Abbildung 90: Massenspektren zweier LC-MS-Fractionen der Fluorescein-RNA-Kopplungsreaktion.....	111
Abbildung 91: LC-MS-basierte Analyse der Kopplungsreaktion von RNA 632 und Verb. 10	113
Abbildung 92: LC-MS-Analyse des Konjugationsansatzes von RNA 848 und Verb. 11	115
Abbildung 93: Untersuchung der inhibitorischen Wirkung des RNA 848-Verb. 11 -Konjugationsprodukts mittels fluoreszenzbasiertem Enzymassays.....	116
Abbildung 94: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der RNA-Synthese.....	118
Abbildung 95: Schematische Darstellung des Asel-Verdaus und anschließender run-off in vitro transcription (IVT).....	119
Abbildung 96: 12%iges denaturierendes PAGE-Gel des Asel-verdauten template-Plasmiden und des IVT-Produkts. (Vollständiges PAGE-Gel siehe Anhang Abbildung 132 A).....	120
Abbildung 97: Auflistung der berechneten Fragmentmassen des RNase T1-verdauten 2-16-RNA-Derivats.....	121
Abbildung 98: Analyse der IVT-Produkte der Y639F-T7-RNAP mittels 12%iger PAGE-Gele.....	123
Abbildung 99: Reihe an Inhibitoren, bei welchen eine S_NAr -Reaktion mit dem katalytischen Thiolat von Mitgliedern der Papain-Familie theoretisch möglich ist.....	125
Abbildung 100: Produkte, die in einer S_NAr -Reaktion zwischen Phenylethanthiol und Verbindung 4.7 nachgewiesen wurden.....	126
Abbildung 101: Massenspektren von Rhodessain vor (Orange) und nach (Blau) der Inkubationen mit den Verbindungen 4.4 (A), 4.7 (B) und 4.8 (C).....	127
Abbildung 102: Chromatogramme und Massenspektren der LC-MS-Läufe von Verbindung 4.7 nach Inkubation in Puffer (A) oder Inkubation mit Rhodessain (B).....	128
Abbildung 103: NMR-basierte Studien zur Rhodessain-katalysierten Hydrolyse von Verbindung 4.7	128
Abbildung 104: Fluoreszenzbasierte Enzymassays der Verbindung 4.8	130
Abbildung 105: (A) Vereinfachtes Energieschema eines Fluoreszenz- und eines PET-Prozesses... 139	
Abbildung 106: Vereinfachte schematische Darstellungen der (PET-)FCS-Messungen.....	141

Abbildung 107: Enzym-katalysierte Hydrolyse des Z-Phe-Arg-AMC-Substrats durch Rhodessain oder andere Proteasen.....	159
Abbildung 108: Pipettierschema zum Erstellen der Verdünnungsreihen.....	160
Abbildung 109: Plasmid-Karte des für IVT-verwendeten Plasmiden.....	167
Abbildung 110: Schema der Chloroform/Phenol-Extraktionsschritte.....	169
Abbildung 111: Plasmid-Karte von pET-11a.....	173
Abbildung 112: Plasmid-Karte des pEGFP-C1-Vektors.....	176
Abbildung 113: Plasmid-Karte des pQE-80-Vektors.....	178
Abbildung 114: 15%ige SDS-PAGE-Gele des Gel-shift-Assays der Pro-Rhodessain-C131A-D175N-D223N-Mutante.....	204
Abbildung 115: 15%ige SDS-PAGE-Gele des Gel-shift-Assays der Pro-Rhodessain-C131A-Mutante.....	204
Abbildung 116: 5%ige SDS-PAGE-Gele des Gel-shift-Assays der Pro-Rhodessain-C131A-E237A-Mutante.....	205
Abbildung 117: Anion exchange chromatography (AEX) und SDS-PAGE-Analyse des Cy5-markierten Pro-Rhodessain-S279C.....	206
Abbildung 118: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs des trypanosomalen blocking peptide nach Inkubation mit Rhodessain.....	207
Abbildung 119: Total-ion-current-Chromatogramm (TIC), UV-Chromatogramm und Massenspektrum des LC-MS-Laufs der Puffer-Kontrolle (blocking peptide + Hydrolysepuffer).....	207
Abbildung 120: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs der Enzym-Kontrolle (Rhodessain + Hydrolysepuffer).....	208
Abbildung 121: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs von Verbindung 4.7.....	209
Abbildung 122: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektrum des LC-MS-Laufs von Verbindung 4.8.....	209
Abbildung 123: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs von Verbindung 4.7 nach Inkubation im Hydrolyse-Puffer.....	210
Abbildung 124: Base Peak-Chromatogramm (BPC) und Massenspektrum des LC-MS-Laufs der Hydrolyse von Verbindung 4.7 durch Rhodessain aus <i>P. pastoris</i>	210
Abbildung 125: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs der Hydrolyse von Verbindung 4.7 durch Rhodessain aus <i>E. coli</i>	211
Abbildung 126: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs der Hydrolyse von Verbindung 4.7 durch Papain.....	211
Abbildung 127: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs nach Inkubation von Verbindung 4.7 mit der inaktiven Rhodessain-C131A-Mutante aus <i>E. coli</i>	212
Abbildung 128: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs nach Inkubation von Verbindung 4.7 mit K11777-inhibiertem Rhodessain-C131A-Mutante aus <i>P. pastoris</i>	212
Abbildung 129: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs der Hydrolyse von Verbindung 4.7 durch humanes Cathepsin L.....	213
Abbildung 130: Vollständige denaturierende PAGE-Gele des Abschnitts 5.....	218
Abbildung 131: Vollständiges Gel des 15%iges denaturierenden PAGE-Gel der Kopplung des Fluorescein-Derivats (MK69) an die RNA 533.....	218

- Abbildung 132: **Total-ion-current-Chromatogramm (TIC)**, UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs des RNA 533-Fluorescein-Konjugats..... 219
- Abbildung 133: **Total-ion-current-Chromatogramm (TIC)**, UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs zur Auftrennung von RNA-Oligomeren unterschiedlicher Länge..... 219
- Abbildung 134: **Total-ion-current-Chromatogramm (TIC)** und Massenspektren des LC-MS-Laufs der RNA-Fragmente des RNase T1-Verdau von RNA 848..... 220
- Abbildung 135: LC-MS-Lauf des RNase T1-verdauten RNA 2-16-Derivats.. 221

10 Anhang

10.1 MD-Simulationen

Tabelle 70: Theoretische pKa-Werte der einzelnen Aminosäureseitenketten basierend auf dem Programm MOE.

Typ	AS	(theo.) pK _a	Typ	AS	(theo.) pK _a
amin	GLU 19	7.65	coo	GLU 141	1.74
coo	GLU 19	4.57	coo	GLU 156	9.09
arg	ARG 21	12.43	coo	ASP 163	3.78
amin	LYS 26	10.29	coo	ASP 166	8.91
amin	LYS 27	10.50	coo	ASP 175	9.46
amin	LYS 28	10.36	coo	GLU 192	2.06
tyr	TYR 29	10.07	tyr	TYR 195	9.23
amin	LYS 31	11.86	tyr	TYR 197	10.33
tyr	TYR 33	13.60	coo	GLU 203	3.69
amin	LYS 34	10.50	his	HIS 212	7.38
coo	ASP 35	2.95	coo	GLU 213	4.64
amin	LYS 37	10.43	coo	ASP 220	3.05
coo	GLU 38	3.89	his	HIS 221	3.11
coo	GLU 39	4.55	coo	ASP 223	3.38
arg	ARG 42	12.01	coo	ASP 227	3.10
arg	ARG 44	11.87	coo	GLU 228	2.59
coo	GLU 47	4.78	coo	ASP 229	3.75
coo	GLU 48	3.93	tyr	TYR 234	10.95
amin	LYS 54	10.50	coo	GLU 237	4.50
tyr	TYR 62	10.00	coo	ASP 246	1.50
coo	ASP 72	2.03	coo	ASP 252	5.45
arg	ARG 75	12.22	tyr	TYR 253	12.34
coo	GLU 76	4.50	coo	GLU 264	4.64
coo	GLU 77	3.85	coo	ASP 267	6.76
arg	ARG 79	12.22	tyr	TYR 275	10.31
arg	ARG 81	11.86	coo	ASP 277	4.09
tyr	TYR 82	12.55	tyr	TYR 283	10.14
arg	ARG 83	12.29	amin	LYS 287	8.54
tyr	TYR 88	10.14	coo	GLU 296	1.13
amin	LYS 94	10.50	coo	ASP 297	3.94
arg	ARG 95	12.50	tyr	TYR 299	10.87
arg	ARG 97	13.19	arg	ARG 301	15.14
amin	LYS 98	10.50	coo	GLU 303	4.78
coo	ASP 112	0.95	amin	LYS 304	10.94
arg	ARG 114	14.12	coo	GLU 324	4.31
coo	GLU 115	4.71	tyr	TYR 327	10.00
amin	LYS 116	10.43	coo	GLN 329	3.07
amin	LYS 123	14.85	hisn	HIS 212	14.38
coo	ASP 124	4.12	hisn	HIS 221	13.81

Tabelle 71: Auflistung der H-Brücken-Wechselwirkungen innerhalb der Pro-Domäne während der MD-Simulationen. Die WW einzelner Aminosäuren sind absteigend nach ihrer Häufigkeit (occup.) aufgelistet. Wechselwirkungen, die von Seitenketten ausgebildet werden, wurden als (S) bezeichnet, Interaktionen des Peptidrückgrats sind als (M) gekennzeichnet. Die Nummerierung der Aminosäuren beginnt fortlaufend bei ^{Pro}Glu19 der Kristallstruktur als Glu1 (AS-Nummer Kristallstruktur = AS-Nummer-MD + 18).

pH 4_1 163 H-Brücken			pH4_2 156 H-Brücken			pH8_1 153 H-Brücken			pH8_2 165 H-Brücken		
Donor	Akzeptor	occup.	Donor	Akzeptor	occup.	Donor	Akzeptor	occup.	Donor	Akzeptor	occup.
Spalte1	Spalte2	Spalte3	Spalte4	Spalte5	Spalte6	Spalte7	Spalte8	Spalte9	Spalte10	Spalte11	Spalte12
ARG24-S	GLU59-S	86.00%	TYR15-S	ASP54-S	70.00%	ARG65-S	GLU58-S	71.90%	ARG24-S	GLU59-S	81.65%
TYR15-S	ASP54-S	68.90%	ARG24-S	GLU59-S	66.45%	TYR15-S	ASP54-S	67.00%	TYR15-S	ASP54-S	76.05%
ARG24-S	ASP54-M	50.55%	GLN38-M	GLN34-M	50.65%	ASN31-S	GLY48-M	50.45%	THR56-S	GLU59-S	52.45%
ARG24-M	GLU20-M	48.05%	ARG24-M	GLU20-M	49.55%	GLN34-M	GLU30-M	49.05%	ARG24-S	ASP54-M	49.90%
LYS8-M	PHE4-M	47.30%	ARG24-S	ASP54-M	45.45%	LYS8-S	GLU21-S	44.20%	ASN31-S	SER53-M	49.65%
ARG65-M	ARG61-M	47.00%	LYS8-M	PHE4-M	45.35%	LYS8-M	PHE4-M	41.55%	LYS8-M	PHE4-M	47.80%
GLN38-M	GLN34-M	46.90%	ASN42-S	GLN38-M	45.05%	ARG24-M	GLU20-M	38.45%	LYS8-S	GLU21-S	45.60%
ARG24-S	GLU20-S	44.50%	GLH29-M	PHE25-M	38.75%	ARG3-S	GLU29-S	37.80%	ARG24-M	GLU20-M	43.30%
ASN42-S	GLN38-M	41.10%	GLH21-M	ASP17-M	36.25%	ARG24-S	ASP54-M	36.50%	ARG24-S	GLU20-S	37.65%
GLH29-M	PHE25-M	38.10%	PHE71-M	GLY67-M	36.15%	ASN42-S	GLN38-M	34.70%	THR56-M	GLU59-S	35.80%
LYS13-S	ASP54-S	35.00%	ARG24-S	GLU20-S	33.35%	GLU21-M	ASP17-M	34.35%	ALA5-M	GLU1-M	35.40%
THR56-S	GLU59-S	34.65%	LYS10-M	ALA6-M	33.20%	ARG61-M	ARG57-M	34.35%	MET32-M	PHE28-M	35.15%
THR56-M	GLU59-S	34.50%	ALA68-M	TYR64-M	32.75%	ARG24-S	GLU59-S	33.85%	ASN31-S	MET55-M	35.05%
ALA62-M	GLH58-M	33.80%	ALA27-M	PHE23-M	31.20%	LYS10-M	ALA6-M	33.65%	GLN38-M	GLN34-M	34.60%
GLH21-M	ASP17-M	32.70%	THR50-S	SER53-S	31.05%	ALA6-M	MET2-M	33.10%	GLU29-M	PHE25-M	34.25%
ALA27-M	PHE23-M	32.60%	ARG63-S	GLU59-S	29.90%	LYS36-S	GLU33-S	31.40%	ARG65-S	GLU58-S	34.05%
ALA5-M	GLH1-M	32.10%	ARG61-M	ARG57-M	28.95%	SER69-S	ASN66-M	30.75%	ASN42-S	GLN38-M	33.45%
LYS10-M	ALA6-M	31.65%	ARG63-M	GLU59-M	28.80%	GLU29-M	PHE25-M	28.85%	THR50-M	SER53-S	32.60%
MET55-M	PHE52-M	31.20%	ALA5-M	GLH1-M	28.55%	ARG24-S	GLU20-S	28.75%	LYS10-M	ALA6-M	29.20%
ARG57-S	GLU30-S	30.10%	ASN31-S	SER53-M	28.30%	PHE25-M	GLU21-M	27.80%	PHE25-M	GLU21-M	29.10%
PHE60-M	THR56-M	28.35%	PHE60-M	THR56-M	26.70%	LYS9-M	ALA5-M	26.45%	PHE28-M	ARG24-M	28.40%
GLN34-M	GLU30-M	27.70%	MET32-M	PHE28-M	25.90%	ALA39-M	ALA35-M	26.20%	LYS13-S	ASP54-S	28.25%
ALA35-M	ASN31-M	26.95%	ARG77-M	ALA73-M	25.40%	ARG57-S	GLU30-S	26.05%	ALA68-M	TYR64-M	28.05%

LYS19-S	ASP17-S	26.40%	PHE28-M	ARG24-M	25.30%	LYS13-S	ASP54-S	25.45%	ALA6-M	MET2-M	27.95%
MET32-M	PHE28-M	24.60%	ASN31-S	MET55-M	24.75%	ALA5-M	GLU1-M	25.40%	ARG61-M	ARG57-M	27.35%
LYS19-M	ASP17-S	23.60%	ARG26-M	ALA22-M	23.95%	THR50-M	SER53-S	23.85%	ALA27-M	PHE23-M	25.10%
THR50-M	SER53-S	23.25%	TYR64-M	PHE60-M	23.85%	ARG57-S	GLN34-S	23.55%	MET55-M	PHE52-M	23.40%
PHE28-M	ARG24-M	22.30%	PHE25-M	GLH21-M	23.35%	THR56-S	GLU59-S	23.30%	LYS9-M	ALA5-M	22.75%
ASN31-S	MET55-M	21.45%	PHE7-M	ARG3-M	21.70%	PHE28-M	ARG24-M	22.90%	GLU21-M	ASP17-M	22.50%
LYS9-M	ALA5-M	21.15%	LYS9-M	ALA5-M	21.45%	ALA62-M	GLU58-M	22.40%	SER69-S	ASN66-M	22.25%
PHE7-M	ARG3-M	20.20%	THR56-S	GLU30-S	20.70%	PHE60-M	THR56-M	18.35%	ALA62-M	GLU58-M	21.65%
ARG26-M	ALA22-M	19.95%	ALA39-M	ALA35-M	19.45%	ARG26-M	ALA22-M	17.60%	LYS36-S	GLU33-S	20.90%
PHE25-M	GLH21-M	18.90%	ALA6-M	MET2-M	16.75%	ALA35-M	ASN31-M	16.90%	ALA74-M	TYR70-M	19.65%
ILE37-M	GLU33-M	18.40%	LYS13-S	ASP54-S	16.55%	MET55-M	PHE52-M	15.40%	PHE71-M	GLY67-M	19.00%
ALA72-M	ALA68-M	17.50%	LYS36-S	GLU33-S	16.55%	ARG77-M	ALA73-M	15.15%	PHE60-M	THR56-M	17.80%
ASN31-S	SER53-M	17.30%	GLN34-M	GLU30-M	16.25%	ALA40-M	LYS36-M	15.10%	PHE7-M	ARG3-M	17.05%
ARG77-M	ALA73-M	16.90%	ALA35-M	ASN31-M	15.95%	THR56-M	GLU59-S	14.70%	ALA35-M	ASN31-M	16.85%
ALA39-M	ALA35-M	16.55%	LYS19-M	ASP17-S	15.80%	SER53-S	ASN31-S	14.30%	ARG26-M	ALA22-M	16.05%
ALA6-M	MET2-M	16.50%	ALA22-M	ALA18-M	14.75%	PHE71-M	GLY67-M	14.25%	ALA39-M	ALA35-M	15.80%
GLU30-M	ARG26-M	16.25%	LYS13-S	PRO51-M	14.45%	LYS13-S	PRO51-M	13.25%	ALA22-M	ALA18-M	14.05%
ALA22-M	ALA18-M	15.60%	ALA72-M	ALA68-M	13.45%	GLN38-S	GLN34-M	12.60%	GLN34-M	GLU30-M	12.85%
ALA73-M	SER69-M	15.25%	GLH21-S	GLH1-S	12.85%	ALA74-M	TYR70-M	12.30%	ARG79-S	ALA74-M	12.60%
ARG61-M	ARG57-M	14.40%	ARG57-S	GLU30-S	12.45%	ASN31-M	ALA27-M	11.35%	ALA40-M	LYS36-M	12.25%
LYS36-S	GLU33-S	13.55%	PHE23-M	LYS19-M	12.35%	LYS19-M	ASP17-S	11.25%	ARG65-M	ARG61-M	12.20%
PHE23-M	LYS19-M	13.30%	GLU33-M	GLH29-M	12.30%	LYS13-M	LYS8-M	11.15%	ARG57-S	GLU30-S	11.90%
ASN31-M	ALA27-M	12.20%	LYS19-S	ASP17-S	12.25%	ALA27-M	PHE23-M	10.50%	GLU20-M	ASP17-S	11.70%
TYR11-M	PHE7-M	11.95%	TYR11-M	PHE7-M	11.65%	THR86-S	VAL84-M	10.40%	LYS13-M	LYS8-M	11.60%
ALA40-M	LYS36-M	11.20%	GLU20-M	ASP17-S	11.30%	MET32-M	PHE28-M	10.35%	ASN31-M	ALA27-M	10.45%
ALA74-M	TYR70-M	11.20%	ASN31-M	ALA27-M	10.50%	ALA22-M	ALA18-M	9.95%	TYR11-M	PHE7-M	9.50%
ALA41-M	ILE37-M	11.10%	GLU30-M	ARG26-M	10.40%	TYR11-M	PHE7-M	9.30%	ARG63-S	ARG63-M	9.50%
ASN31-S	ALA27-M	10.70%	LYS8-S	GLH21-S	9.50%	GLU20-M	ASP17-S	9.20%	SER69-S	ARG65-M	9.20%
ALA45-M	ASN42-M	10.15%	ILE37-M	GLU33-M	9.25%	ARG26-S	GLU30-S	8.50%	ALA41-M	ILE37-M	8.90%
LYS13-M	LYS8-M	9.95%	TYR70-M	ASN66-M	7.85%	ARG3-M	GLU1-S	8.40%	ALA72-M	ALA68-M	8.35%
GLN75-M	PHE71-M	9.70%	LYS16-S	ASP17-S	7.55%	PHE7-M	ARG3-M	8.30%	LYS16-M	GLU20-S	8.30%

TYR64-M	ARG61-M	9.55%	THR56-S	ASN31-S	7.50%	ARG24-S	ASP54-S	8.20%	PHE23-M	LYS19-M	7.60%
LYS8-S	GLH21-S	8.30%	LYS13-M	LYS8-M	6.45%	ALA45-M	ASN42-M	7.75%	ALA45-M	ASN42-M	6.75%
ALA68-M	ARG65-M	7.90%	SER53-M	THR50-M	6.45%	LYS76-M	ALA72-M	7.65%	ILE37-M	GLU33-M	6.45%
GLU20-M	ASP17-S	7.30%	LYS76-M	ALA72-M	5.80%	LYS19-S	ASP17-S	7.00%	ARG26-S	GLU30-S	6.40%
GLY67-M	TYR64-M	7.20%	ALA40-M	LYS36-M	5.40%	ALA68-M	TYR64-M	6.75%	ARG3-M	GLU1-S	6.35%
SER69-S	ASN66-M	7.00%	ARG57-S	ASN31-S	4.85%	ALA72-M	ALA68-M	6.70%	TYR70-M	ASN66-M	5.30%
ARG63-M	GLU59-M	6.55%	ARG65-S	ASN66-S	4.40%	GLN75-S	PHE71-M	6.00%	GLN75-S	ALA72-M	5.10%
GLU59-M	THR56-S	6.25%	THR86-S	VAL84-M	4.20%	GLN38-M	GLN34-M	5.60%	GLU30-M	ARG26-M	5.05%
THR56-S	GLU30-S	6.10%	ALA62-M	GLH58-M	3.95%	ALA41-M	ILE37-M	5.55%	ARG57-S	GLU30-M	4.80%
LYS13-S	PRO51-M	4.55%	MET55-M	PHE52-M	3.95%	GLU30-M	ARG26-M	5.00%	ARG63-M	GLU59-M	4.55%
GLU33-M	GLH29-M	4.50%	ALA41-M	ILE37-M	3.85%	ASN42-M	GLN38-M	4.80%	LYS76-M	ALA73-M	4.50%
LYS76-M	ALA72-M	4.10%	THR50-M	SER53-S	3.85%	ALA73-M	SER69-M	4.75%	ALA73-M	SER69-M	4.45%
SER53-M	THR50-M	3.70%	SER69-S	ASN66-M	3.85%	THR86-S	THR85-M	4.65%	LYS19-S	ASP17-S	4.45%
GLH21-S	GLH1-S	3.45%	ALA74-M	PHE71-M	3.70%	GLN75-M	PHE71-M	4.20%	LYS19-M	ASP17-S	4.35%
LYS16-M	GLU20-S	3.35%	ASN42-M	ALA39-M	3.65%	SER53-M	THR50-M	4.15%	ASN42-M	GLN38-M	4.25%
ARG79-S	ALA74-M	3.20%	THR86-S	THR85-M	3.55%	PHE23-M	LYS19-M	3.85%	GLU33-M	GLU29-M	3.95%
ARG61-S	GLH58-S	3.05%	LYS76-M	ALA73-M	2.90%	LYS8-S	GLU1-S	3.50%	ARG65-M	ALA62-M	3.40%
ARG63-S	TYR64-S	2.80%	LYS16-S	GLU20-S	2.85%	LYS16-M	GLU20-S	3.30%	ARG57-S	ASN31-S	3.25%
ASN42-M	GLN38-M	2.75%	LYS16-M	GLU20-S	2.65%	ARG3-S	GLU1-S	3.25%	LYS13-S	PRO51-M	3.15%
THR81-S	ARG79-M	2.65%	ARG79-S	GLN75-S	2.55%	TYR64-M	ARG61-M	3.10%	ARG61-S	PHE60-M	3.15%
GLY87-M	THR85-S	2.35%	GLN75-M	ALA72-M	2.25%	LYS16-S	ASP17-S	3.10%	SER53-M	THR50-M	3.10%
GLY12-M	LYS9-M	2.20%	ALA73-M	SER69-M	2.05%	GLN75-M	ALA72-M	2.55%	ARG65-S	ARG61-M	2.90%
LYS36-M	MET32-M	2.15%	THR81-S	ARG79-M	1.95%	PHE52-M	THR50-S	2.15%	LYS16-S	ASP17-S	2.90%
GLN34-S	GLU30-M	2.15%	ARG61-S	GLH58-S	1.85%	TYR70-M	GLY67-M	2.10%	LYS16-S	GLU20-S	2.55%
LYS76-M	ALA73-M	2.10%	GLH58-S	GLU30-S	1.80%	GLY12-M	LYS9-M	1.90%	ARG77-M	ALA73-M	2.45%
THR50-S	SER53-S	2.10%	GLH1-S	GLH21-S	1.75%	ARG65-M	ARG61-M	1.85%	SER69-M	ARG65-M	2.45%
GLN38-S	GLN34-S	1.85%	ASN31-S	ALA27-M	1.70%	LYS76-M	ALA73-M	1.85%	SER69-M	ASN66-M	2.35%
GLN75-S	PHE71-M	1.70%	ASN42-M	GLN38-M	1.50%	LYS36-M	GLU33-M	1.80%	ARG57-S	GLN34-S	2.25%
ARG79-S	GLN75-S	1.65%	ARG57-S	GLU30-M	1.40%	SER69-M	ASN66-M	1.65%	GLN75-M	PHE71-M	2.25%
ARG57-S	GLN34-S	1.60%	GLY12-M	LYS9-M	1.25%	LYS36-S	MET32-M	1.65%	TYR64-M	ARG61-M	2.05%
GLN75-S	ALA72-M	1.60%	GLY67-M	TYR64-M	1.25%	ALA74-M	PHE71-M	1.55%	TYR64-M	PHE60-M	1.85%

ARG57-M	GLU30-S	1.55%	ALA41-M	GLN38-M	1.10%	GLY67-M	TYR64-M	1.50%	ASN31-S	ALA27-M	1.85%
PHE52-M	THR50-S	1.50%	ARG65-M	ARG63-M	1.10%	ARG77-S	LEU78-M	1.45%	GLN75-S	PHE71-M	1.70%
GLN34-S	GLU30-S	1.50%	GLH58-M	THR56-S	1.05%	ARG63-M	PHE60-M	1.15%	GLY12-M	LYS9-M	1.70%
ARG77-M	ALA74-M	1.50%	ARG65-S	ALA62-M	0.90%	ARG65-M	ALA62-M	1.15%	LYS36-M	MET32-M	1.65%
THR86-S	THR85-M	1.35%	GLU59-M	THR56-M	0.90%	ARG77-S	ALA73-M	1.15%	THR86-S	VAL84-M	1.60%
GLN38-S	GLN34-M	1.25%	LYS36-M	MET32-M	0.85%	THR56-S	GLU30-S	1.10%	THR56-S	GLU30-S	1.35%
SER53-S	THR50-M	1.20%	ARG57-M	ASN31-S	0.75%	ALA73-M	TYR70-M	1.05%	SER53-S	ASN31-S	1.35%
LYS8-S	GLH1-S	1.10%	ARG65-M	ALA62-M	0.75%	ARG77-M	ALA74-M	1.05%	LYS76-S	GLN75-S	1.30%
GLN75-M	ALA72-M	1.00%	LYS36-M	GLU33-M	0.75%	THR50-S	SER53-S	0.95%	ARG77-M	ALA74-M	1.25%
LYS36-M	GLU33-M	0.95%	ALA73-M	TYR70-M	0.75%	ILE37-M	GLU33-M	0.90%	ARG88-S	THR85-S	1.20%
ASN42-M	ALA39-M	0.85%	ARG79-S	ALA74-M	0.75%	ARG77-S	LYS76-M	0.90%	PHE52-M	THR50-S	1.15%
ARG57-S	GLU30-M	0.80%	SER69-M	ASN66-M	0.70%	GLU33-M	GLU30-M	0.90%	THR81-M	ARG79-M	1.10%
GLH58-M	GLH58-S	0.70%	LYS76-S	GLN75-S	0.70%	LYS80-S	LEU78-M	0.75%	GLU1-M	GLU1-S	1.00%
ARG26-S	GLH29-S	0.65%	ALA45-M	ASN42-M	0.65%	ILE37-M	GLN34-M	0.75%	ALA74-M	PHE71-M	1.00%
LYS76-S	ALA72-M	0.65%	THR81-M	ARG79-M	0.60%	ASN42-M	ALA39-M	0.70%	LYS76-S	ALA72-M	0.95%
SER69-M	ASN66-M	0.60%	GLU59-M	THR56-S	0.60%	TYR70-M	ASN66-M	0.60%	GLN75-M	GLN75-S	0.95%
TYR70-M	GLY67-M	0.60%	GLH58-M	GLH58-S	0.55%	GLU33-M	GLU29-M	0.55%	ALA73-M	TYR70-M	0.90%
GLN34-S	GLN38-S	0.55%	THR56-S	GLH58-S	0.50%	LYS76-S	ALA72-M	0.55%	ARG26-S	ALA22-M	0.90%
ASN66-M	ALA62-M	0.55%	TYR11-S	VAL49-M	0.50%	ARG88-S	GLY87-M	0.50%	GLU59-M	THR56-S	0.90%
ALA74-M	PHE71-M	0.55%	ARG26-S	GLH29-S	0.50%	ASN66-S	TYR70-S	0.45%	GLY67-M	TYR64-M	0.85%
THR81-M	ARG79-M	0.55%	ARG57-S	GLH58-S	0.50%	GLU58-M	THR56-S	0.45%	THR86-S	THR85-M	0.80%
GLH1-S	GLH21-S	0.50%	THR56-M	GLU59-S	0.45%	ARG63-M	GLU59-M	0.45%	ARG63-M	PHE60-M	0.70%
PHE71-M	GLY67-M	0.45%	TYR70-M	GLY67-M	0.45%	LYS36-M	MET32-M	0.45%	SER53-S	THR50-M	0.70%
LYS16-S	ASP17-S	0.45%	LYS76-S	ALA72-M	0.40%	GLU59-M	THR56-S	0.45%	ASN42-M	ALA39-M	0.65%
THR86-S	VAL84-M	0.45%	ARG65-S	ARG63-M	0.40%	TYR64-M	PHE60-M	0.40%	ARG88-S	GLY87-M	0.65%
ASN66-S	ALA62-M	0.40%	ARG88-S	THR86-M	0.35%	SER53-S	THR50-M	0.40%	LYS36-S	MET32-M	0.60%
LYS8-S	LYS13-M	0.40%	LYS8-S	LYS13-M	0.30%	PHE4-M	GLU1-M	0.40%	LYS36-M	GLU33-M	0.55%
ARG65-M	ALA62-M	0.25%	LYS9-S	ALA5-M	0.30%	ALA68-M	ARG65-M	0.35%	THR81-S	ARG79-M	0.55%
LYS36-S	MET32-M	0.25%	ARG77-S	LEU78-M	0.30%	TYR64-S	PHE60-S	0.35%	TYR70-M	GLY67-M	0.50%
PHE71-M	ALA68-M	0.25%	LYS16-S	VAL14-M	0.30%	MET32-M	GLU29-M	0.35%	ARG63-S	TYR64-S	0.50%

ARG77-S	LEU78-M	0.25%	ARG77-S	LYS76-M	0.25%	LYS76-S	GLN75-S	0.30%	GLU59-M	THR56-M	0.45%
ALA68-M	TYR64-M	0.20%	ARG88-S	GLY87-M	0.25%	ARG57-M	ASN31-S	0.20%	VAL84-M	VAL82-M	0.45%
ARG63-S	PHE52-S	0.20%	ARG57-M	GLU30-S	0.25%	THR81-M	ARG79-M	0.20%	ALA68-M	ARG65-M	0.45%
ARG79-S	ARG77-M	0.20%	LYS36-S	MET32-M	0.25%	THR81-S	VAL82-M	0.20%	GLN75-M	ALA72-M	0.40%
LYS10-S	TYR11-S	0.15%	ARG26-S	ALA22-M	0.25%	ARG26-S	GLU29-S	0.20%	PHE4-M	GLU1-M	0.30%
ASN66-S	ASN66-M	0.15%	ILE37-M	GLN34-M	0.20%	ARG88-S	THR86-M	0.20%	GLU20-M	ASP17-M	0.30%
ARG57-S	THR56-S	0.15%	PHE52-M	THR50-S	0.20%	ARG61-S	GLU58-S	0.20%	THR85-S	THR86-M	0.25%
ARG63-M	PHE60-M	0.15%	GLH29-S	GLU33-S	0.20%	SER69-M	ARG65-M	0.20%	ARG26-S	ARG26-M	0.25%
GLU59-M	THR56-M	0.15%	LYS8-S	GLH1-S	0.15%	ARG26-S	ALA22-M	0.15%	ASN66-S	ARG63-M	0.20%
ARG77-S	LYS76-M	0.15%	ASN66-S	ARG63-M	0.15%	GLN75-S	ALA74-M	0.15%	GLY87-M	THR85-M	0.20%
ALA73-M	TYR70-M	0.15%	ALA74-M	TYR70-M	0.15%	PHE71-M	ALA68-M	0.15%	ALA62-M	GLU59-M	0.20%
ARG88-S	THR86-M	0.15%	PHE4-M	GLH1-M	0.15%	LYS10-S	TYR11-S	0.15%	GLN34-S	GLN38-S	0.20%
GLN75-S	ALA74-M	0.10%	ARG26-S	GLU30-S	0.15%	GLU1-M	GLU1-S	0.15%	ALA41-M	GLN38-M	0.20%
THR86-M	VAL84-M	0.10%	GLN38-S	GLN34-M	0.10%	ARG61-S	ARG57-M	0.15%	ARG26-S	GLU29-S	0.20%
ARG77-S	ALA73-M	0.10%	GLU20-M	ASP17-M	0.10%	GLY67-M	ARG63-M	0.10%	ARG57-M	GLU30-S	0.15%
ARG65-S	ASN66-S	0.10%	ARG57-S	GLN34-S	0.10%	ARG79-M	ARG77-M	0.10%	ARG24-S	ASP54-S	0.15%
GLN34-S	ASN31-S	0.10%	MET55-M	SER53-M	0.10%	ASN66-S	ARG63-M	0.10%	ILE37-M	GLN34-M	0.15%
ASN83-S	ASN83-M	0.10%	GLN75-S	GLN75-M	0.10%	LYS10-M	PHE7-M	0.10%	MET2-M	GLU1-S	0.15%
ARG26-S	GLU30-S	0.10%	GLN75-S	ALA72-M	0.10%	VAL84-M	VAL82-M	0.10%	ARG88-S	THR86-M	0.15%
LYS76-S	ALA73-M	0.10%	GLN75-S	PHE71-M	0.05%	ARG24-S	GLU20-M	0.10%	LYS8-S	LYS13-M	0.15%
ALA35-M	MET32-M	0.10%	ARG63-S	ARG63-M	0.05%	THR46-S	ALA45-M	0.10%	ARG77-S	LYS76-M	0.15%
TYR70-M	ASN66-M	0.05%	ASN66-S	ASN66-M	0.05%	SER69-S	ARG65-M	0.10%	GLU58-M	THR56-S	0.10%
TYR64-S	PHE60-S	0.05%	GLY12-M	LYS8-M	0.05%	GLU59-M	THR56-M	0.05%	GLU58-M	GLU58-S	0.10%
GLH58-M	THR56-S	0.05%	ASN66-S	TYR70-S	0.05%	SER53-S	THR50-S	0.05%	LYS16-S	VAL14-M	0.10%
VAL84-M	VAL82-M	0.05%	ARG61-S	ARG57-M	0.05%	ALA41-M	GLN38-M	0.05%	ARG65-S	ALA62-M	0.10%
LEU78-M	LYS76-M	0.05%	ARG65-S	ARG65-M	0.05%	ALA6-M	ARG3-M	0.05%	ARG88-S	THR86-S	0.10%
SER69-S	ASN66-S	0.05%	PHE60-M	ARG57-M	0.05%	THR46-S	THR46-M	0.05%	LYS76-M	ALA72-M	0.10%
ARG63-S	PHE60-M	0.05%	ARG57-S	THR56-S	0.05%	LYS80-S	THR81-M	0.05%	PHE4-M	GLU1-S	0.10%
THR85-S	THR85-M	0.05%	SER69-S	ARG65-M	0.05%	LYS80-S	LYS80-M	0.05%	ARG57-M	ASN31-S	0.05%
ARG63-M	ARG61-M	0.05%	SER53-M	THR50-S	0.05%	THR85-S	ASN83-S	0.05%	GLY67-M	ASN66-S	0.05%
ARG79-M	ARG77-M	0.05%	LYS10-S	TYR11-S	0.05%	ARG65-S	GLU58-M	0.05%	ASN83-S	ASN83-M	0.05%

THR85-S	ASN83-S	0.05%	ARG77-S	TYR70-S	0.05%	LYS76-S	GLN75-M	0.05%	ARG61-M	GLU58-M	0.05%
VAL84-M	ASN83-S	0.05%	ARG63-M	PHE60-M	0.05%	GLU20-M	ASP17-M	0.05%	ASN66-S	TYR70-S	0.05%
LYS10-S	VAL49-M	0.05%	ALA62-M	GLU59-M	0.05%	GLN38-M	ALA35-M	0.05%	ASP17-M	TYR15-M	0.05%
THR85-S	THR86-M	0.05%	GLN38-S	GLN34-S	0.05%	MET2-M	GLU1-S	0.05%	ARG65-S	ASN66-S	0.05%
ALA41-M	GLN38-M	0.05%	LYS9-S	LYS9-M	0.05%	TYR70-S	ASN66-S	0.05%	ARG79-S	LEU78-M	0.05%
LYS76-S	LYS76-M	0.05%	THR46-S	THR46-M	0.05%	ASP17-M	GLU20-S	0.05%	TYR44-M	ASN42-M	0.05%
GLY12-M	LYS8-M	0.05%	ALA40-M	ILE37-M	0.05%	ASN83-S	THR85-S	0.05%	ALA45-M	PRO43-M	0.05%
ASN66-M	ARG61-M	0.05%	SER53-S	THR50-M	0.05%				THR50-S	SER53-S	0.05%
LYS80-S	THR81-M	0.05%	GLY87-M	THR85-M	0.05%				ARG3-S	PHE47-M	0.05%
THR81-S	LYS80-M	0.05%	ARG77-M	ALA74-M	0.05%				LYS9-S	ALA5-M	0.05%
TYR44-M	ASN42-M	0.05%							LYS8-S	GLU1-S	0.05%
ALA40-M	ILE37-M	0.05%							LYS13-S	VAL14-M	0.05%
ASN66-S	ARG63-M	0.05%							GLN34-S	GLN34-M	0.05%
LYS10-M	PHE7-M	0.05%							LYS10-M	PHE7-M	0.05%
MET32-M	GLH29-M	0.05%							ASN66-S	ASN66-M	0.05%
LYS76-S	GLN75-S	0.05%							ALA72-M	SER69-M	0.05%
TYR11-S	THR50-M	0.05%							LYS76-M	GLN75-S	0.05%

Tabelle 72: Auflistung der H-Brücken-Wechselwirkungen zwischen Pro-Domäne und katalytischer Domäne während der MD-Simulationen. Die WW einzelner Aminosäuren sind absteigend nach ihrer Häufigkeit (occup.) aufgelistet. Wechselwirkungen, die von Seitenketten ausgebildet werden, wurden als (S) bezeichnet. Interaktionen des Peptidrückgrats sind als (M) gekennzeichnet. Die Nummerierung der Aminosäuren beginnt fortlaufend bei ^{Pro}Glu19 der Kristallstruktur als Glu1 (AS-Nummer Kristallstruktur = AS-Nummer-MD + 18).

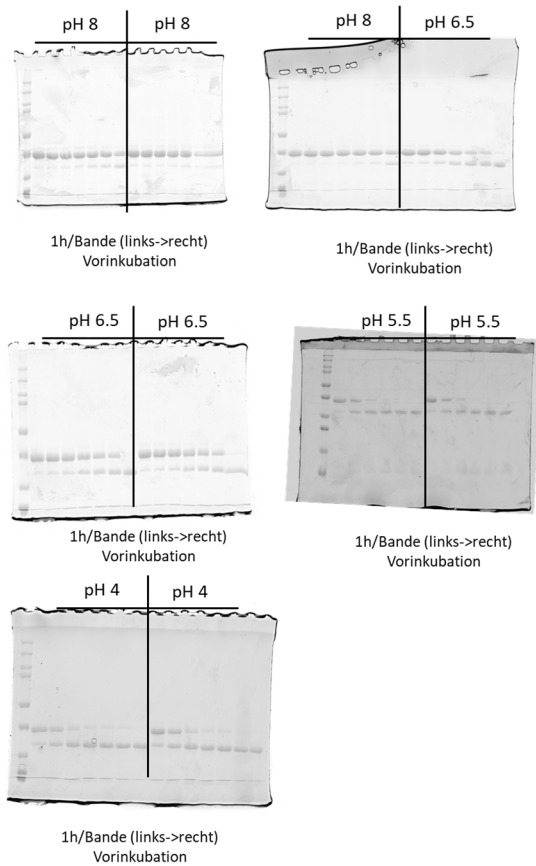
pH 4_1			pH4_2			pH8_1			pH8_2		
163 H-Brücken			156 H-Brücken.			Found 153 H-Brücken			Found 165 H-Brücken.		
Donor	Akzeptor	occup.	Donor	Akzeptor	occup.	Donor	Akzeptor	occup.	Donor	Akzeptor	occup.
TYR64-S	CYM113-S	64.50%	THR46-M	GLY237-M	43.50%	GLN34-S	ASP234-S	66.50%	GLN38-S	ASP234-S	60.30%
ASH234-S	GLN34-S	63.10%	ASH234-S	ASN31-S	41.40%	THR50-S	MET233-M	43.95%	ARG79-S	ASP205-S	52.35%
SER231-S	GLN38-S	57.50%	THR50-S	MET233-M	39.25%	THR46-M	GLY237-M	39.15%	THR46-M	GLY237-M	41.35%
SER53-S	MET233-M	46.15%	GLY48-M	ASH234-M	38.65%	SER242-M	ASN42-S	36.40%	VAL82-M	ASP205-M	41.10%
VAL82-M	ASP205-M	44.55%	SER242-M	ASN42-S	36.25%	VAL82-M	ASP205-M	34.05%	ASP205-M	LYS80-M	37.95%
ASN42-S	SER242-M	38.85%	VAL82-M	ASP205-M	33.60%	GLY48-M	ASP234-M	33.05%	THR50-S	MET233-M	37.65%
THR46-M	GLY237-M	36.10%	SER53-S	ASH234-S	32.15%	ARG79-S	VAL297-M	29.15%	LYS80-M	ASP205-S	34.70%
GLY48-M	ASH234-M	34.95%	ILE239-M	TYR44-M	25.70%	ASN236-S	VAL49-M	27.30%	SER242-M	ASN42-S	27.05%
SER242-M	ASN42-S	26.20%	ARG65-S	ASP228-S	20.35%	ASN31-S	ASP234-S	25.45%	TYR70-S	ASP148-S	25.60%
ASP205-M	LYS80-M	26.20%	TYR70-S	ILE147-M	19.85%	GLN38-S	ASP234-S	24.20%	ILE239-M	TYR44-M	24.30%
GLN34-S	THR230-M	22.75%	ASP205-M	LYS80-M	18.00%	ILE239-M	TYR44-M	23.70%	TYR11-S	MET275-M	23.90%
LYS80-M	ASP205-S	21.15%	ASN236-S	VAL49-M	17.80%	ARG77-S	ASP205-S	21.85%	GLY48-M	ASP234-M	23.80%
ASN236-S	VAL49-M	19.05%	ARG63-S	GLN109-S	17.15%	TYR70-S	ASP148-S	21.05%	ARG79-S	ASP157-S	22.05%
GLN38-S	SER231-M	18.30%	LYS80-M	ASP205-S	15.85%	ARG79-S	ASP157-S	19.60%	ARG61-S	THR230-S	20.35%
GLN38-S	ASH234-S	17.15%	ASN236-M	THR46-M	12.10%	THR244-S	GLN38-S	18.35%	ASN236-S	VAL49-M	17.85%
ARG77-S	ASN158-S	16.85%	LYS80-S	HIP203-M	8.85%	ASN236-M	THR46-M	11.80%	ARG77-S	ASN158-S	17.55%
TYR70-S	ILE147-M	16.55%	ARG79-S	ASP205-S	8.00%	ASN66-S	GLY152-M	11.20%	ASN66-S	GLY152-M	16.45%
THR241-M	ASN42-S	16.10%	THR241-M	ASN42-S	7.85%	ARG61-S	THR230-S	9.75%	ARG77-S	ASP157-S	15.05%
LYS80-S	ASP202-S	13.30%	LYS80-S	ASP202-S	6.75%	ARG77-S	ASP157-S	9.05%	LYS80-S	HIE203-M	14.35%
GLN208-S	GLN75-S	12.80%	TYR70-S	GLY152-M	6.50%	LYS80-M	ASP205-S	7.25%	THR244-S	GLN38-S	14.30%

THR244-S	GLN38-S	12.60%	ASN42-S	SER242-M	6.35%	GLN75-S	GLN295-M	6.70%	ARG61-S	ASP249-S	13.00%
ASN83-M	TYR309-M	12.25%	ARG79-S	VAL297-M	5.95%	ASN42-S	SER242-M	5.05%	ASN236-M	THR46-M	9.20%
ASN236-M	THR46-M	12.20%	GLN208-S	GLN75-S	5.30%	GLN75-S	GLN295-S	5.00%	GLN34-S	ASP234-S	8.90%
THR244-M	GLN38-S	11.90%	GLN75-S	GLN295-S	5.15%	TYR70-S	GLY152-M	3.75%	LYS80-S	ASP202-S	8.65%
ILE239-M	TYR44-M	11.65%	ASN66-S	GLY152-M	4.90%	ARG61-S	GLU246-S	3.60%	GLN38-S	SER231-M	7.60%
GLN247-S	ALA68-M	9.15%	GLN38-S	THR244-S	4.15%	ARG79-S	SER298-S	3.35%	ASN42-S	SER242-M	7.50%
ARG79-S	VAL297-M	7.25%	ARG88-S	ASP211-S	3.95%	GLN38-S	SER231-M	3.00%	ARG63-S	GLN109-S	7.15%
THR244-S	GLN34-S	6.85%	ARG79-S	LEU206-M	3.90%	GLN75-S	GLN208-S	2.70%	ARG88-S	GLU219-S	6.55%
GLN75-S	GLN208-S	6.35%	ARG79-S	GLN295-M	3.70%	GLN295-S	ALA74-M	2.30%	SER231-S	GLN38-S	5.70%
ARG61-S	GLH246-S	5.85%	GLN34-S	ASH234-S	3.65%	ARG61-S	ASP249-S	2.10%	GLN38-S	SER231-S	5.40%
GLY67-M	GLY152-M	5.70%	ARG77-S	ASN158-S	3.55%	ARG63-S	GLN109-S	2.00%	GLN75-S	GLN295-S	5.00%
GLY87-M	ALA215-M	5.00%	TYR11-S	MET275-M	3.35%	THR241-M	ASN42-S	1.90%	GLN75-S	GLN295-M	4.65%
THR50-S	MET233-M	4.30%	ASH234-S	ASN31-M	3.25%	GLY237-M	THR46-M	1.75%	THR241-M	ASN42-S	4.60%
TYR70-S	ASN158-S	4.20%	GLN75-S	GLN208-S	3.20%	GLN107-S	TYR64-S	1.75%	SER242-S	ALA41-M	3.80%
ARG63-S	GLN109-S	4.00%	GLY237-M	THR46-M	2.80%	SER231-S	GLN38-S	1.55%	PHE149-M	TYR70-S	3.40%
LYS80-S	HIP203-M	3.50%	SER231-S	GLN38-S	2.55%	GLN38-S	THR230-M	1.50%	TYR70-S	GLY152-M	3.35%
ARG79-S	ASP205-S	3.40%	SER242-S	ALA41-M	2.30%	ARG79-S	LEU206-M	1.30%	GLN38-S	THR244-S	3.25%
GLY237-M	THR46-M	2.90%	GLN38-S	THR230-M	1.80%	TYR64-S	CYM113-S	1.25%	GLY237-M	THR46-M	2.75%
ARG79-S	LEU206-M	2.75%	ARG79-S	GLN295-S	1.55%	ARG77-S	ASN158-S	1.25%	ARG65-S	GLN247-S	1.65%
ASN83-S	LEU308-M	2.45%	GLN38-S	ASH234-S	1.35%	ARG79-S	ASP205-S	1.25%	LYS80-S	HIE203-S	1.50%
GLH219-S	THR85-S	2.35%	GLN38-S	SER231-M	1.30%	GLN295-S	GLN75-S	1.20%	ASN31-S	ASP234-S	1.40%
GLN75-S	GLN295-S	1.60%	GLN295-S	GLN75-S	0.90%	GLN247-S	ALA68-M	1.10%	GLN295-S	GLN75-S	1.35%
ASN66-M	GLY152-M	1.60%	ARG79-S	ASH157-S	0.85%	TYR11-S	MET275-M	1.05%	GLN247-S	ALA68-M	1.20%
THR85-S	ASN220-S	1.60%	GLN295-S	ALA74-M	0.85%	ARG88-S	ALA89-M	1.00%	GLN38-S	THR230-M	1.00%
ASN83-S	GLN311-S	1.55%	ARG88-S	ALA89-M	0.65%	THR85-S	GLU219-S	0.95%	ARG63-S	GLN109-M	1.00%
SER242-S	ALA41-M	1.50%	THR244-S	GLN38-S	0.55%	LEU248-M	GLN75-S	0.60%	ARG79-S	VAL297-M	0.75%
GLN107-S	TYR64-S	1.35%	GLH219-S	THR85-S	0.50%	GLN208-S	GLN75-S	0.55%	TRP272-S	TYR64-S	0.75%
THR46-S	GLY237-M	1.25%	ASH234-S	GLN34-S	0.35%	GLN38-S	SER231-S	0.50%	ARG88-S	ALA89-M	0.75%
THR85-S	GLH219-S	1.25%	ARG65-S	GLN247-S	0.35%	ASP205-M	LYS80-M	0.45%	GLN208-S	GLN75-S	0.65%
ARG79-S	SER298-S	1.25%	THR85-S	GLH219-S	0.30%	THR46-S	GLY237-M	0.40%	ARG63-S	GLY108-M	0.55%
ASN236-S	GLY48-M	1.20%	THR46-S	GLY237-M	0.25%	SER242-S	ALA41-M	0.40%	THR85-S	GLU219-S	0.45%

10.2 SDS-PAGE-Gele des Gel-shift-Assays

Bei den dargestellten Gelen handelt es sich um 15%ige SDS-PAGE-Gele, welche mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt wurden. Als DNA-Marker wurde der Precision Plus Protein Dual Color Standard (*Bio-Rad*, Hercules, Kalifornien, USA) verwendet.

Pro-Rhodesain-C131A-D175N-D223N



Pro-Rhodesain-C131A

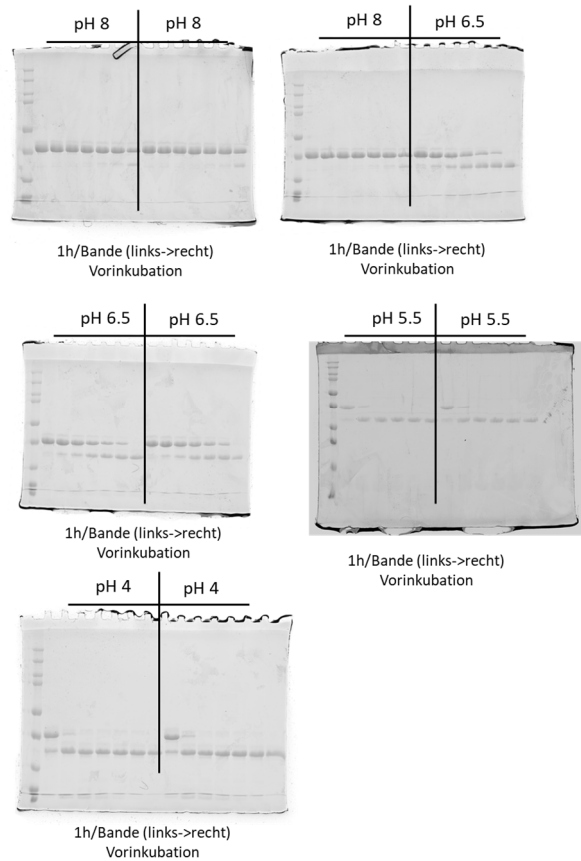


Abbildung 114: 15%ige SDS-PAGE-Gele des Gel-shift-Assays der Pro-Rhodesain-C131A-D175N-D223N-Mutante.

Abbildung 115: 15%ige SDS-PAGE-Gele des Gel-shift-Assays der Pro-Rhodesain-C131A-Mutante

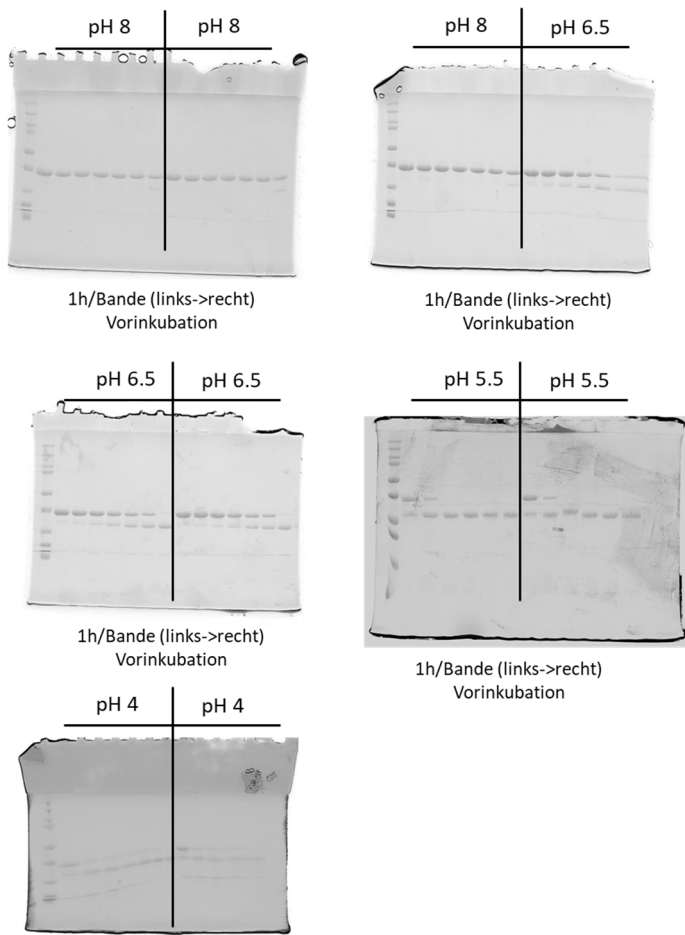


Abbildung 116: 5%ige SDS-PAGE-Gele des Gel-shift-Assays der Pro-Rhodesain-C131A-E237A--Mutante.

10.3 Chromatogramme und Massenspektren der Hydrolyse des trypanosomalen *blocking peptide* durch Rhodessain

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Chromatogramme und Massenspektren der Hydrolyse des trypanosomalen *blocking peptide* durch Rhodessain, sowie die zugehörigen Kontrollen dargestellt.

Hydrolyseversuch: Rhodessain + *blocking peptide*

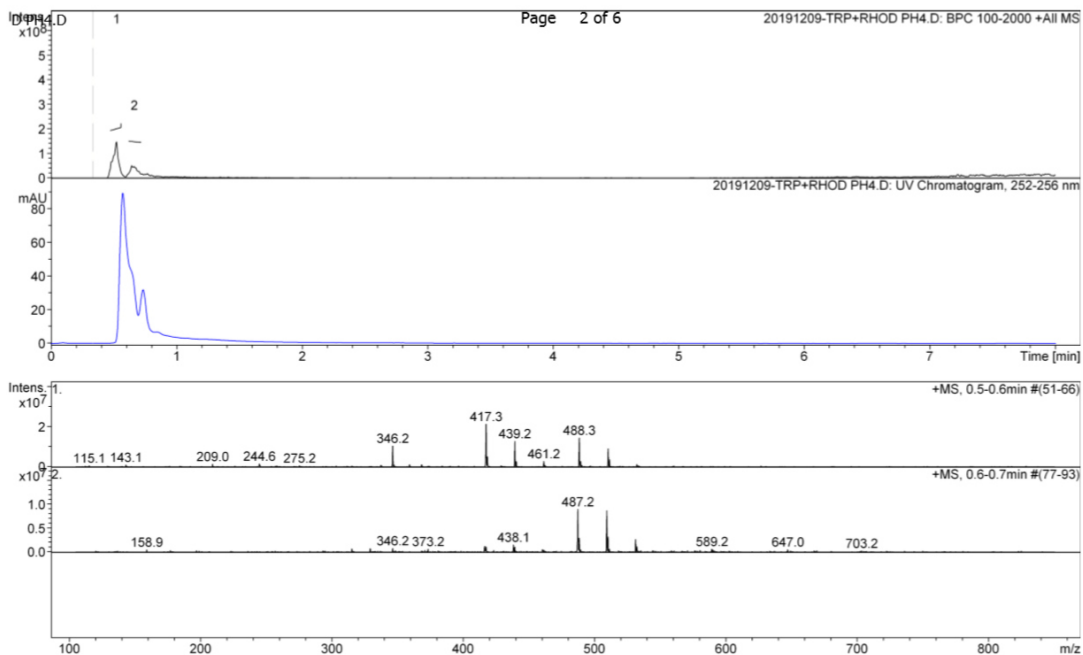


Abbildung 118: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs des trypanosomalen *blocking peptide* nach Inkubation mit Rhodessain.

Puffer-Kontrolle: *blocking peptide* in Hydrolysepuffer

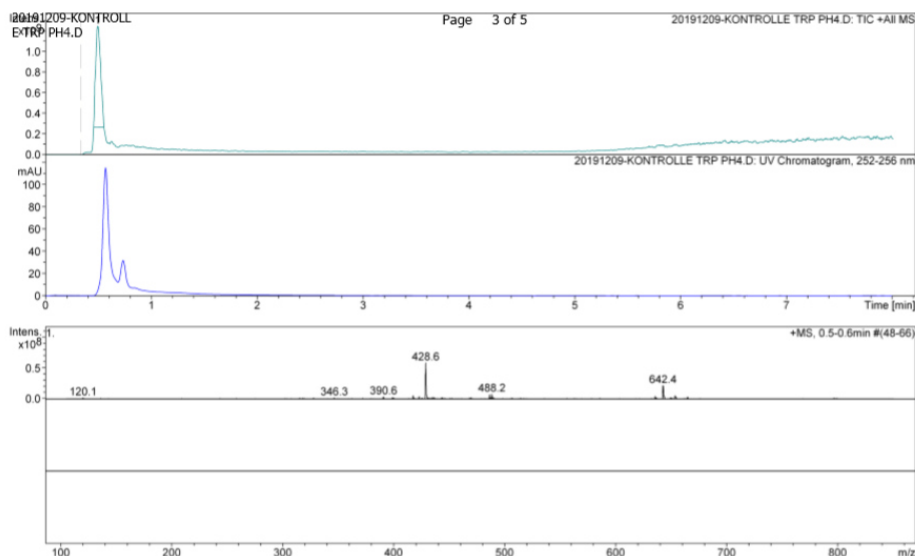


Abbildung 119: Total-ion-current-Chromatogramm (TIC), UV-Chromatogramm und Massenspektrum des LC-MS-Laufs der Puffer-Kontrolle (*blocking peptide* + Hydrolysepuffer).

Enzym-Kontrolle: Rhodesain in Hydrolysepuffer

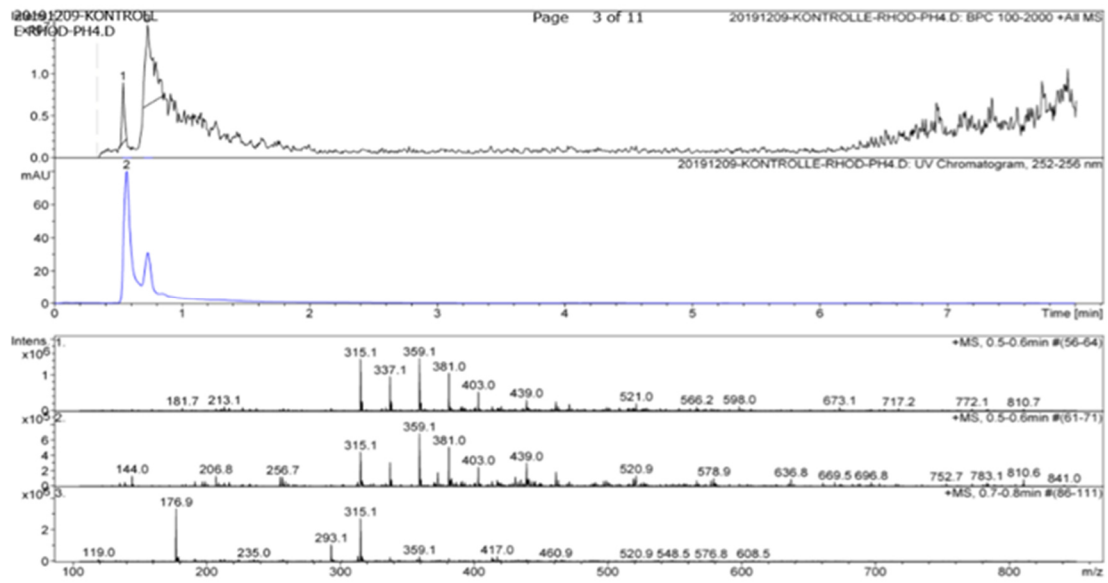


Abbildung 120: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs der Enzym-Kontrolle (Rhodesain + Hydrolysepuffer).

10.4 Chromatogramme und Massenspektren der Hydrolyse von Verb. 4.7 durch Rhodospain

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Chromatogramme und Massenspektren der Hydrolyse der Verbindung 4.8 durch Rhodospain, sowie die zugehörigen Kontrollen dargestellt.

Verb. 4.7 Standard

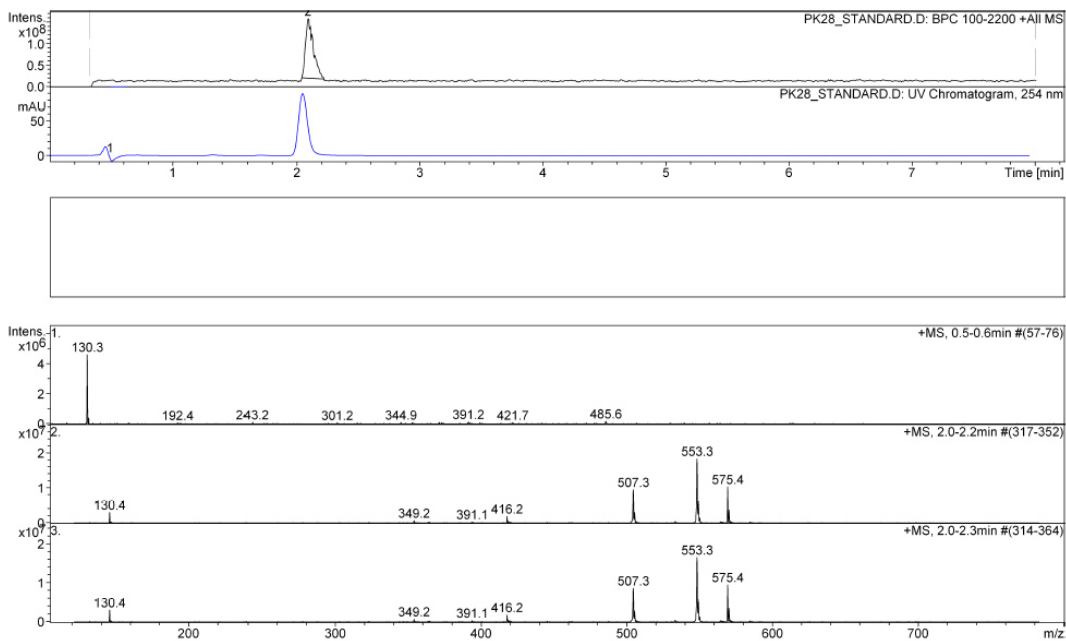


Abbildung 121: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs von Verbindung 4.7.

Verb. 4.8 Standard

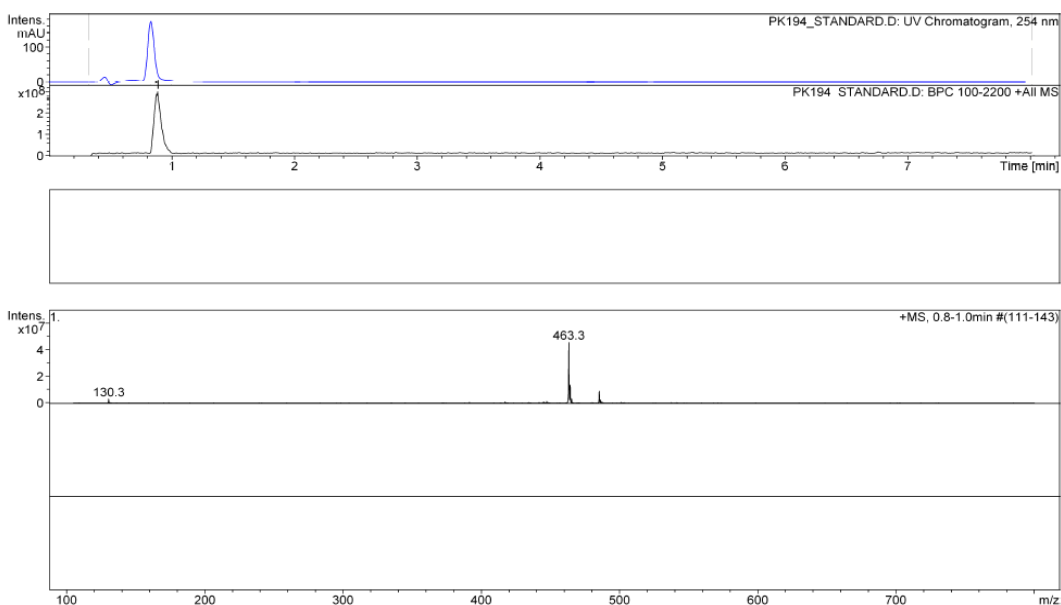


Abbildung 122: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektrum des LC-MS-Laufs von Verbindung 4.8.

Kontrolle Verb. 4.7 in Puffer

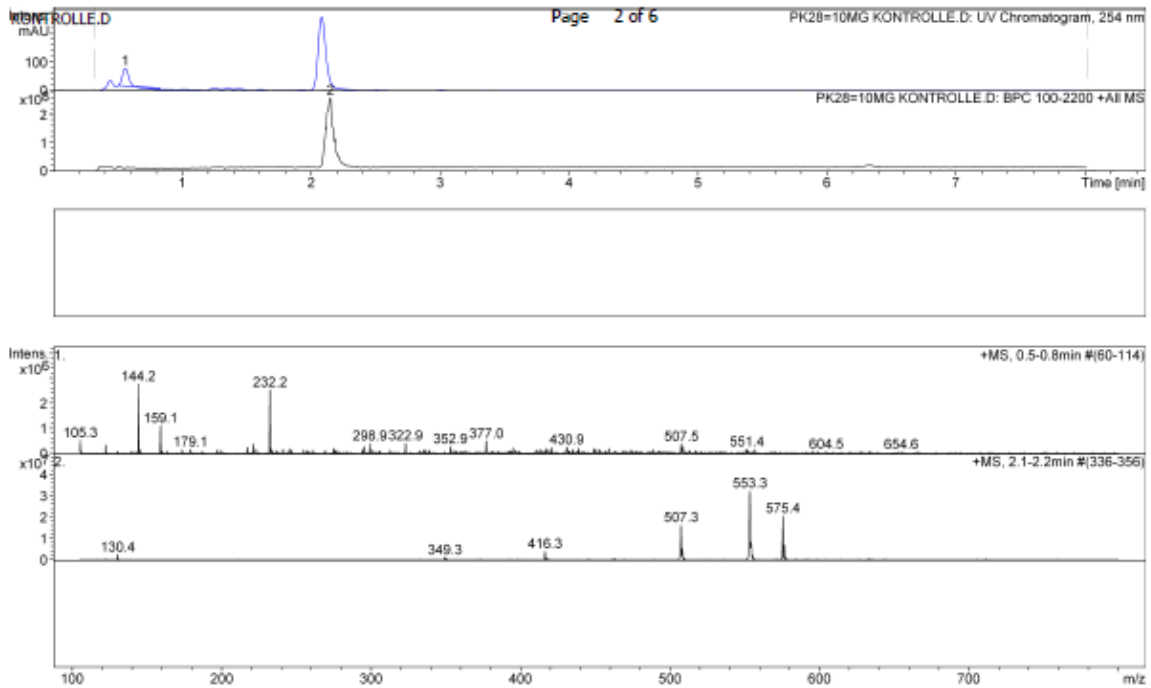


Abbildung 123: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs von Verbindung 4.7 nach Inkubation im Hydrolyse-Puffer.

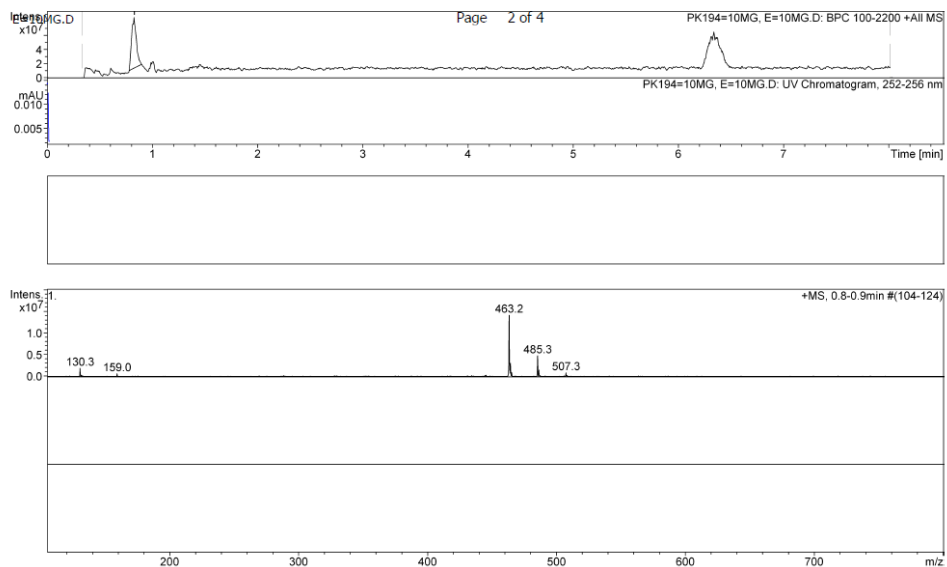
4.7 + Rhodospain (Rhodospain aus *P. pastoris*)

Abbildung 124: Base Peak-Chromatogramm (BPC) und Massenspektrum des LC-MS-Laufs der Hydrolyse von Verbindung 4.7 durch Rhodospain aus *P. pastoris*.

4.7 + Rhodesain (Rhodesain aus *E. coli*)

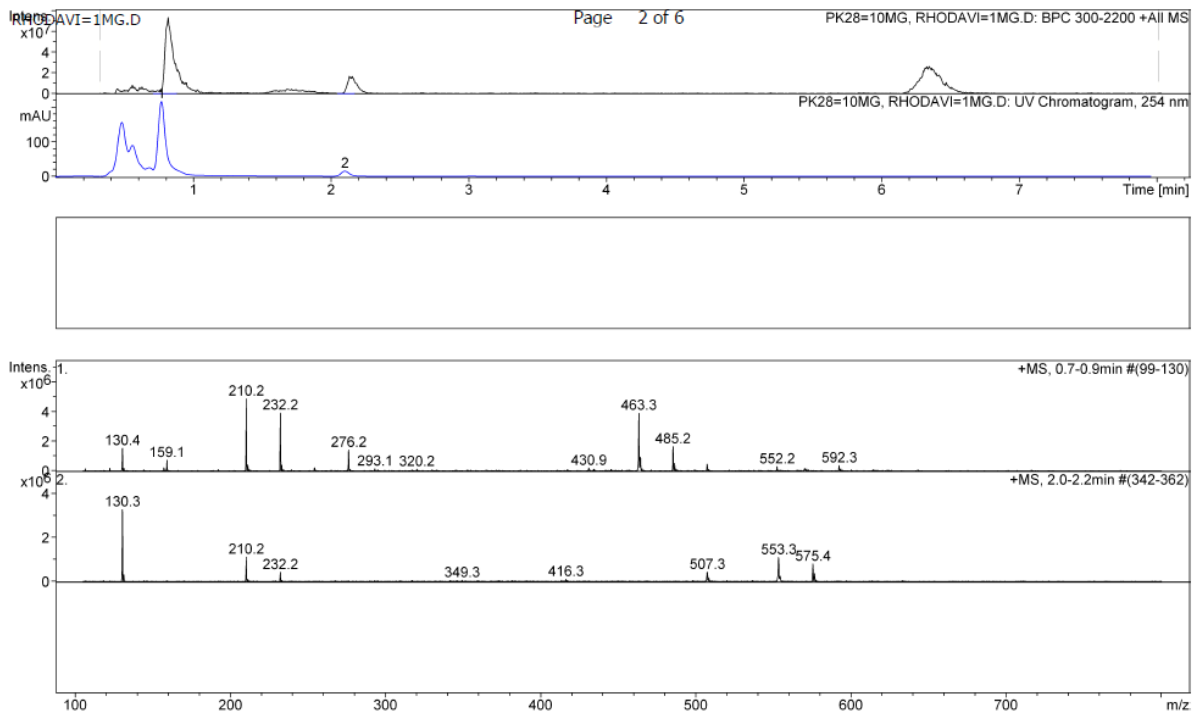


Abbildung 125: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs der Hydrolyse von Verbindung 4.7 durch Rhodesain aus *E. coli*.

4.7 + Papain

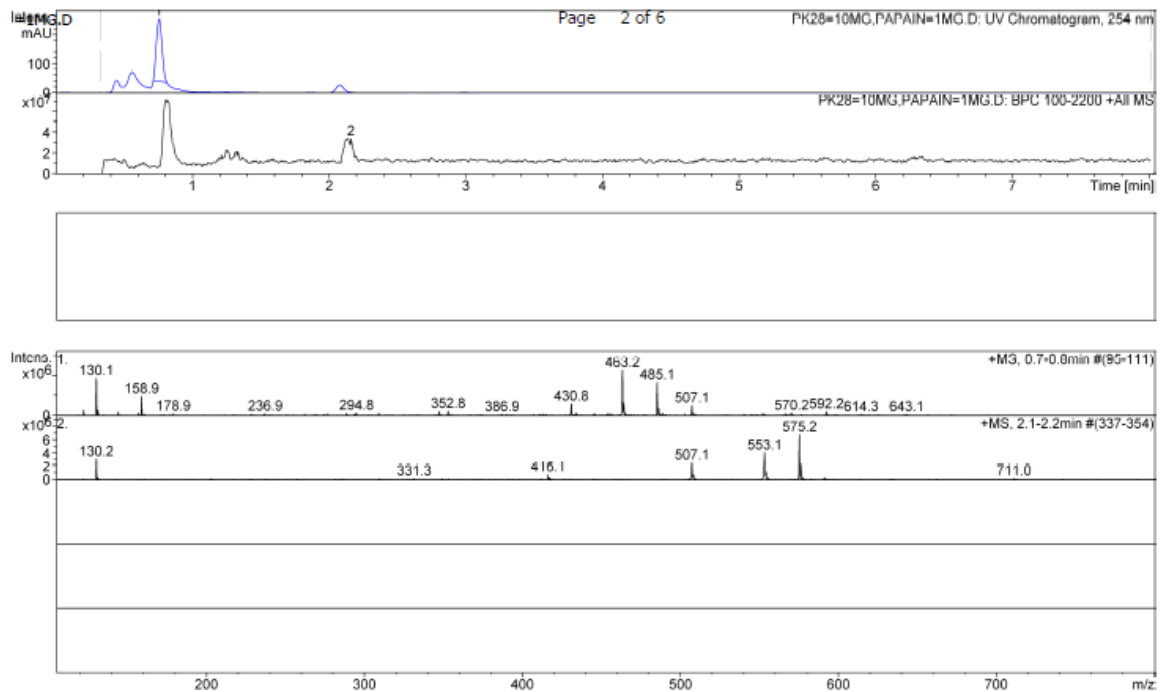


Abbildung 126: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs der Hydrolyse von Verbindung 4.7 durch Papain.

Kontrolle; Inkubation von 4.7 mit inaktivem Rhodessin C131A.

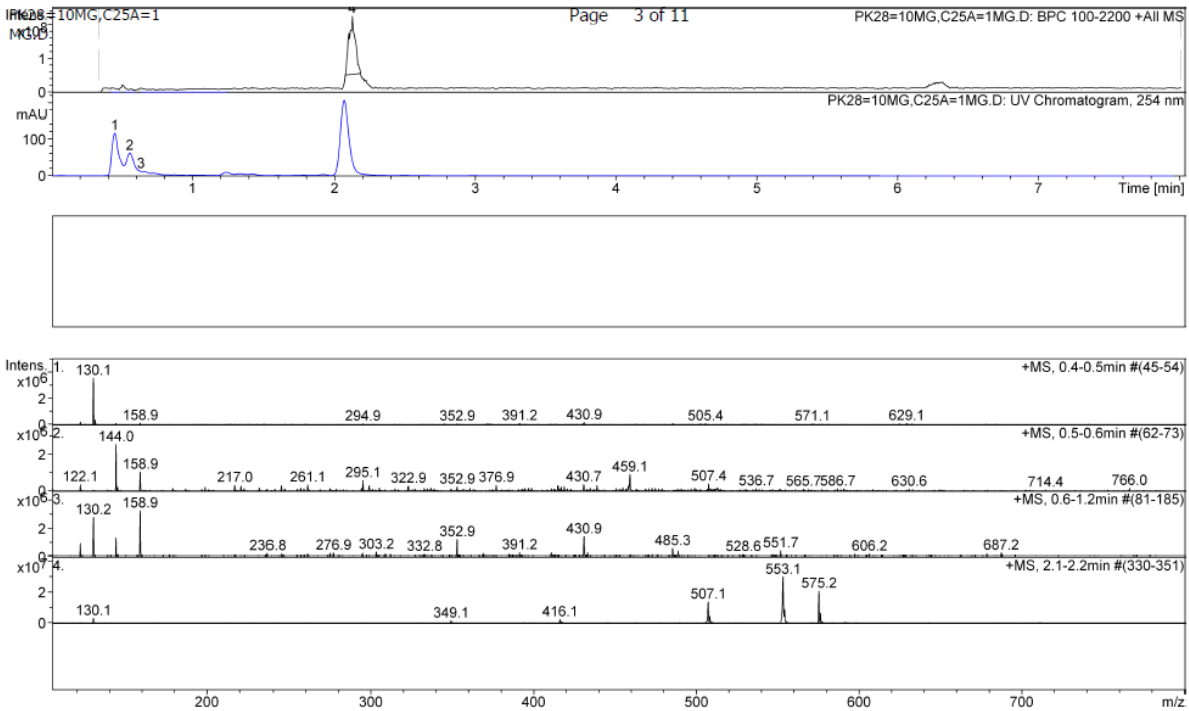


Abbildung 127: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs nach Inkubation von Verbindung 4.7 mit der inaktiven Rhodessin-C131A-Mutante aus E. coli.

Kontrolle; Inkubation von 4.8 mit K11777-inhibiertem Rhodessin aus P. pastoris.

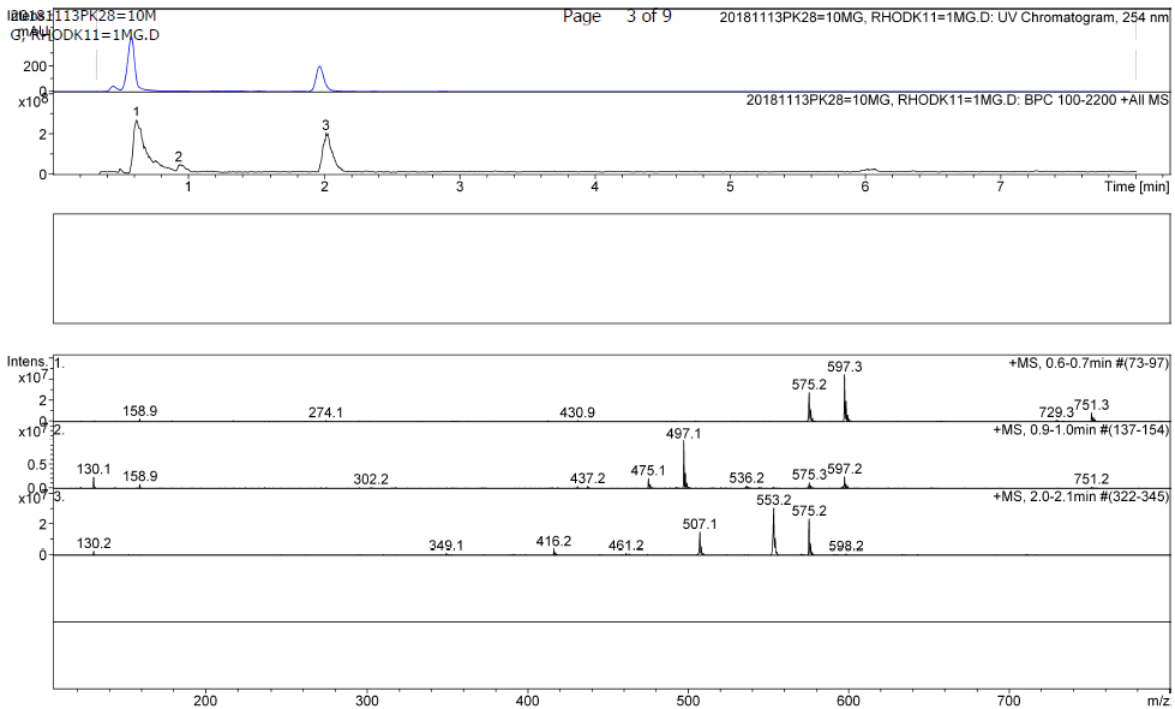


Abbildung 128: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs nach Inkubation von Verbindung 4.8 mit K11777-inhibiertem Rhodessin-C131A-Mutante aus P. pastoris.

4.7+ hCathL

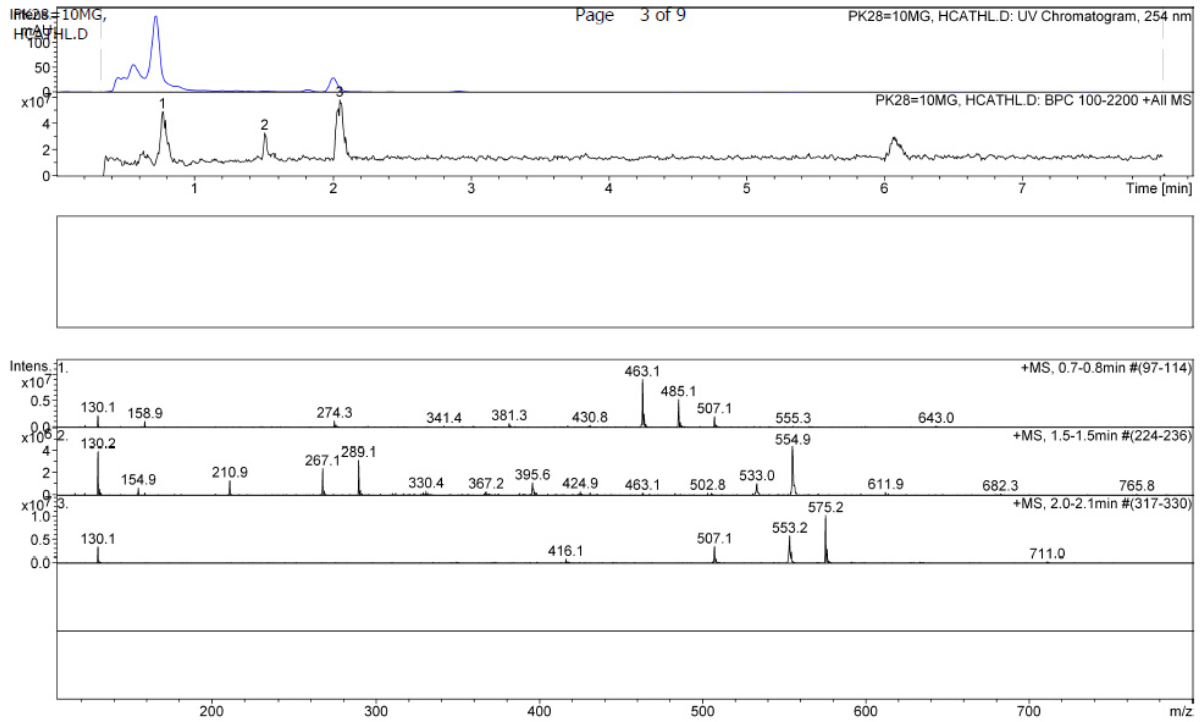
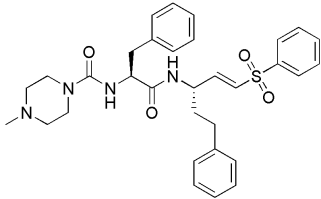
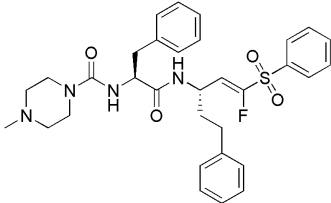
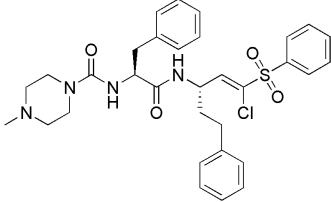
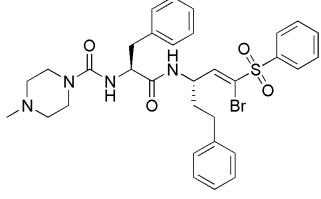
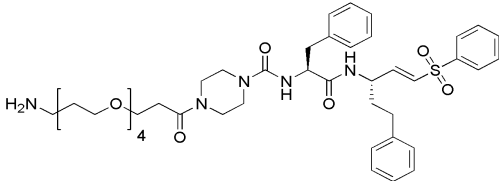
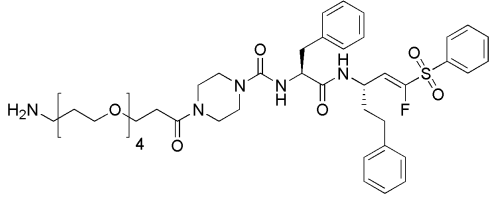
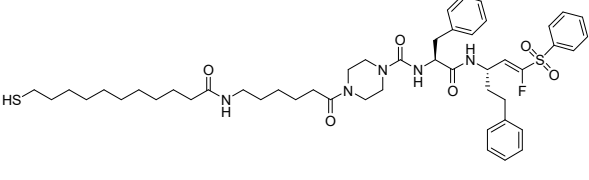
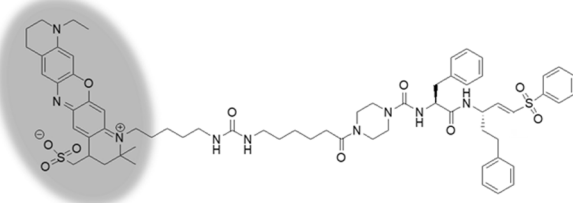
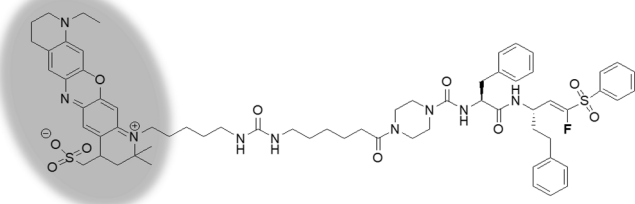
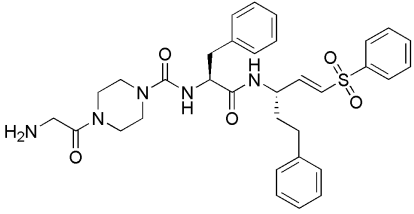
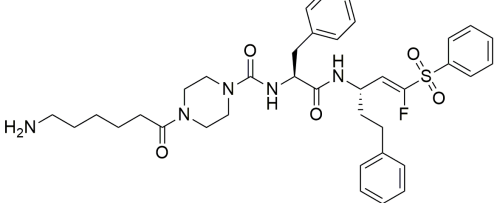
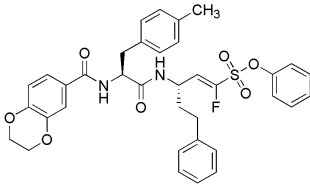


Abbildung 129: Base Peak-Chromatogramm (BPC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs der Hydrolyse von Verbindung 4.7 durch humanes Cathepsin L.

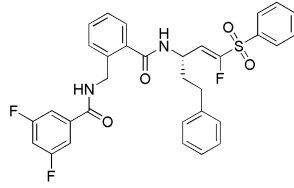
10.5 Liste verwendeter Inhibitoren

Tabelle 73: Tabellarische Auflistung der Strukturen, K_D - und K_i -Werte aller verwendeter Inhibitoren. Inhibitoren, deren Nummerierung grau unterlegt wurde, wurden nicht durch ITC untersucht Mit (*) markierte Werte beziehen sich auf Gleichgewichtskonstanten von irreversiblen Inhibitoren. Da diese Inhibitoren kein Gleichgewicht zwischen gebundenem und nicht-gebundenem Zustand ausbilden, dürfte für sie keine Gleichgewichtskonstante existieren. Dennoch konnte auch für irreversible Inhibitoren in ITC-Messungen ein K_D -Wert bestimmt werden, welcher für die Berechnung der ΔG - und $-T\Delta S$ -Terme verwendet wurde.

Verb.	Strukturformel	K_D [nM]	K_i [nM]
1		3.0 ± 0.47 *	4
2		343.5 ± 35.5	190
3		n.d.	1010
4		n.d.	860
5		5.12 ± 0.21 *	1.2 ± 0.1 (IC_{50})

6		30.83 ± 3.84	96.6 ± 24.4
7		n.d.	51 ± 12 (iSPR)
8		n.d.	n.d.
9		n.d.	n.d.
10		n.d.	n.d.
11		n.d.	n.d.
12		n.d.	10

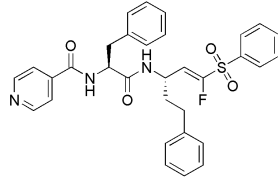
19



n.d.

574

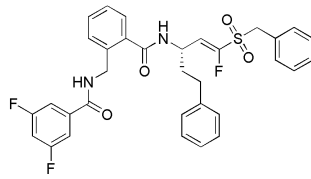
20



n.d.

608

21



n.d.

15

10.6 Vollständige PAGE-Gele des Abschnitts

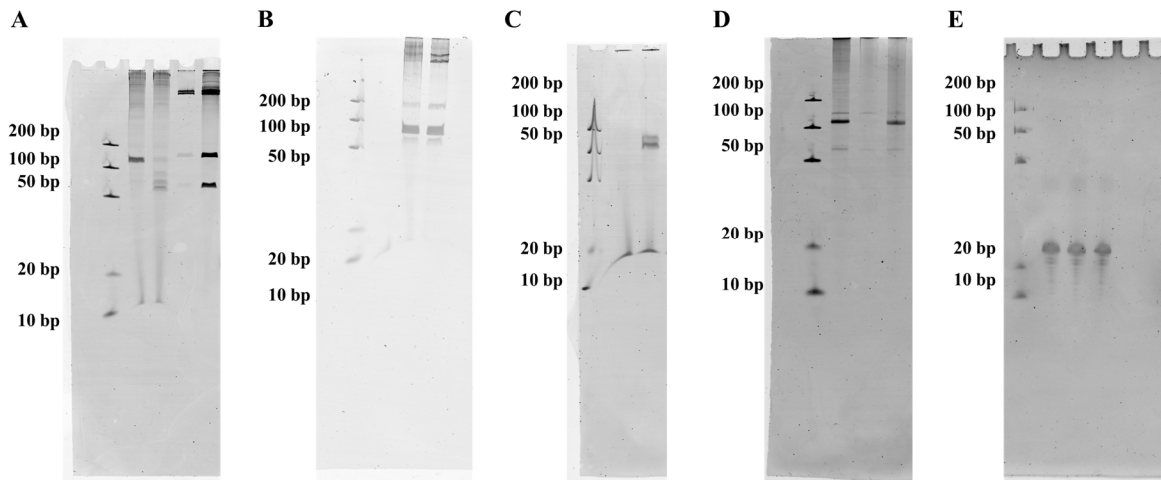


Abbildung 130: Vollständige denaturierende PAGE-Gele des Abschnitts 5.

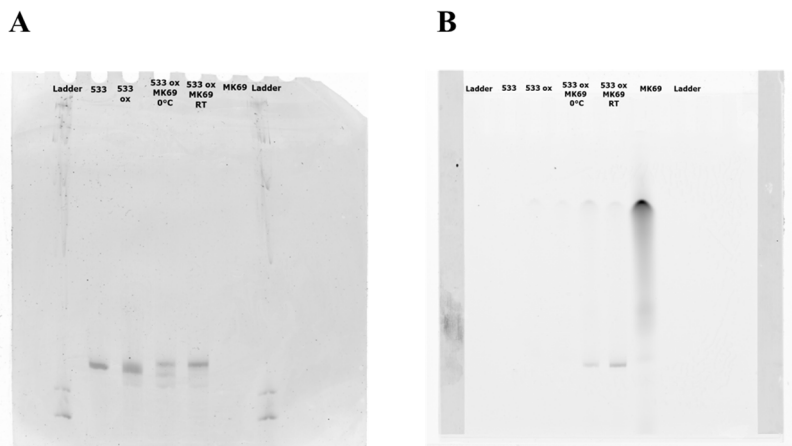


Abbildung 131: Vollständiges Gel des 15%igen denaturierenden PAGE-Gel der Kopplung des Fluorescein-Derivats (MK69) an die RNA 533. (A) Vor dem Anfärben mit GelRed bei einer Wellenlänge von 610 nm, (B) nach dem Anfärben mit GelRed bei einer Wellenlänge von 526 nm.

10.7 LC-MS-Läufe des Kapitels 5

LC-MS-Lauf der Kopplung von Fluorescein an RNA 533

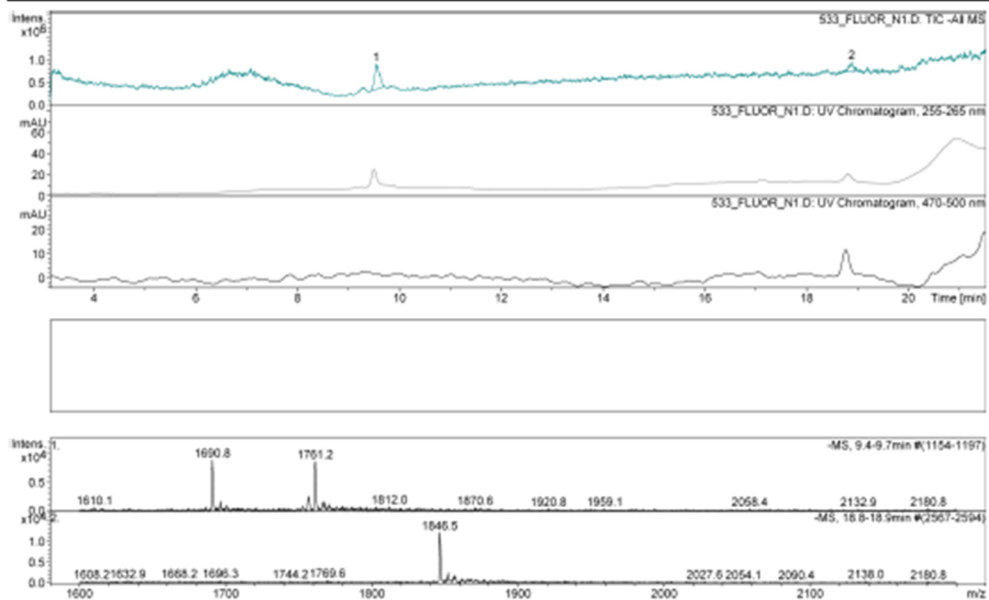


Abbildung 132: Total-ion-current-Chromatogramm (TIC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs des RNA 533-Fluorescein-Konjugats.

LC-MS-Lauf zur Auftrennung kleinerer RNA-Fragmente

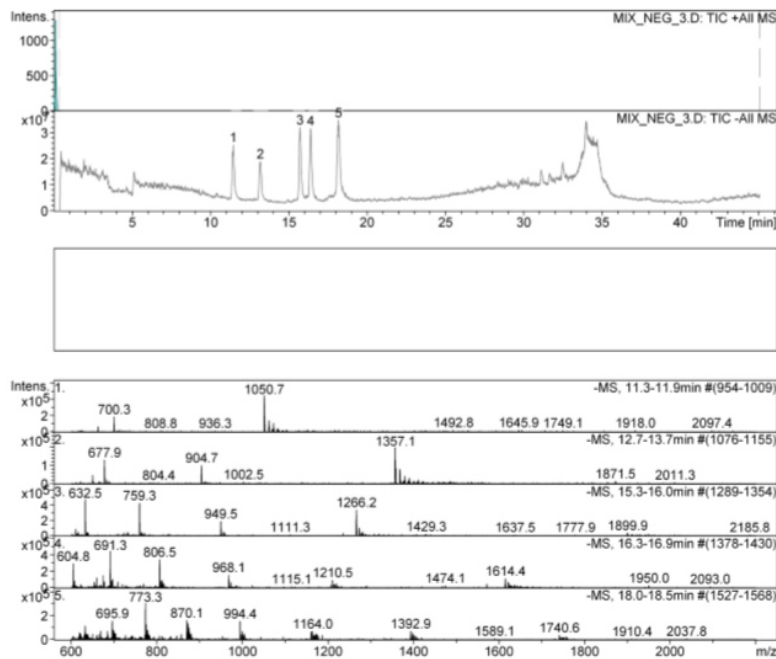


Abbildung 133: Total-ion-current-Chromatogramm (TIC), UV-Chromatogramm und Massenspektren des LC-MS-Laufs zur Auftrennung von RNA-Oligomeren unterschiedlicher Länge.

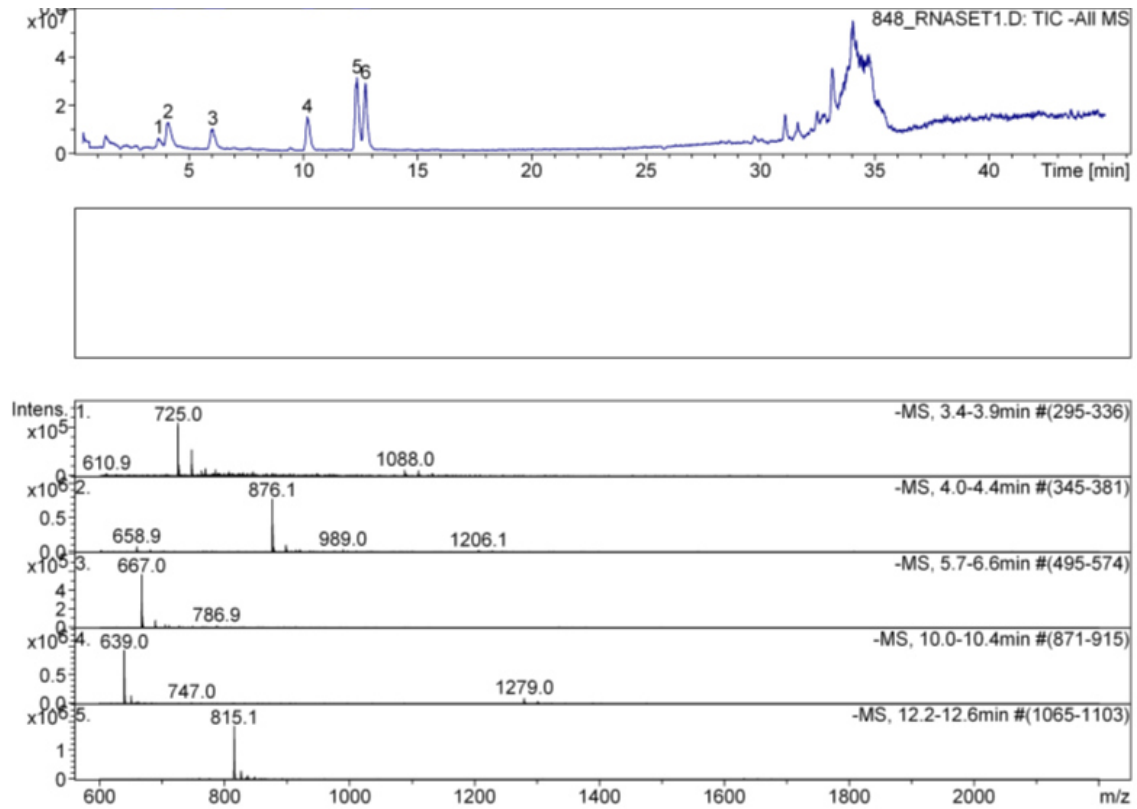


Abbildung 134: Total-ion-current-Chromatogramm (TIC) und Massenspektren des LC-MS-Laufs der RNA-Fragmente des RNase T1-Verdau von RNA 848.

LC-MS-Lauf des RNase T1-verdauten RNA 2-16-Derivat

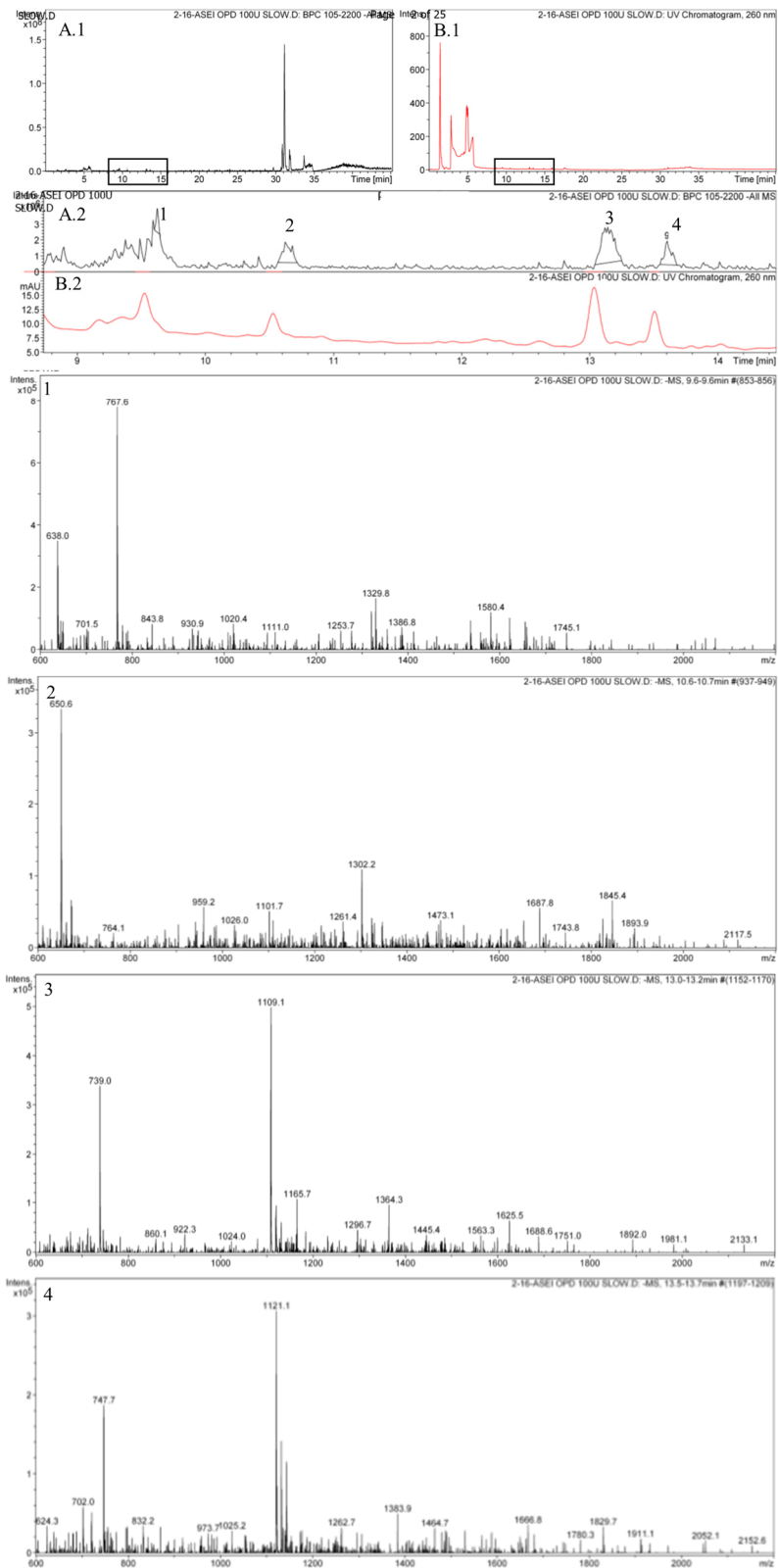


Abbildung 135: LC-MS-Lauf des RNase T1-verdauten RNA 2-16-Derivats. Der Bereich des Base Peak-Chromatogramms (BPC; A.1) und das UV-Chromatogramms bei einer Wellenlänge von 260 nm (B.1), in welchem die RNA-Fragmente eluierten, sind unter A.2 und B.2 vergrößert dargestellt. Die Fragmentesignale (1 – 4) sind nummeriert und die dazugehörigen Massenspektren aufgeführt.

11 Quellen

1. Berriman, M. *et al.* The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* (80-.). **309**, 416–422 (2005).
2. Simarro, P. P. *et al.* Estimating and Mapping the Population at Risk of Sleeping Sickness. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, 1–12 (2012).
3. Ponte-Sucre, A. An overview of *trypanosoma brucei* infections: An intense host-parasite interaction. *Front. Microbiol.* **7**, 1–12 (2016).
4. Kennedy, P. G. E. Human African trypanosomiasis of the CNS: Current issues and challenges. *J. Clin. Invest.* **113**, 496–504 (2004).
5. Matthews, K. R. 25 years of African trypanosome research: From description to molecular dissection and new drug discovery. *Mol. Biochem. Parasitol.* **200**, 30–40 (2015).
6. Garcia-Salcedo, J. A., Unciti-Broceta, J. D., Valverde-Pozo, J. & Soriano, M. New approaches to overcome transport related drug resistance in trypanosomatid parasites. *Front. Pharmacol.* **7**, 1–14 (2016).
7. Vincent, I. M. *et al.* A molecular mechanism for eflornithine resistance in African trypanosomes. *PLoS Pathog.* **6**, 1–9 (2010).
8. Ettari, R. *et al.* Inhibition of rhodesain as a novel therapeutic modality for human African trypanosomiasis. *J. Med. Chem.* **56**, 5637–5658 (2013).
9. Bridges, D. J. *et al.* Loss of the High-Affinity Pentamidine Transporter Is Responsible for High Levels of Cross-Resistance between Arsenical and Diamidine Drugs in African Trypanosomes. *Mol. Pharmacol.* **71**, 1098–1108 (2007).
10. Baker, N. *et al.* Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in African trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 10996–11001 (2012).
11. Graf, F. E. *et al.* Comparative genomics of drug resistance in *Trypanosoma brucei* rhodesiense. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 3387–3400 (2016).
12. Carter, N, S. & Fairlamb, A, H. Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. *Nature* **361**, 173–176 (1993).
13. Langousis, G. & Hill, K. L. Motility and more Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 505–18 (2014).
14. Coura, J. R. & Borges-Pereira, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* **115**, 5–13 (2010).
15. De Fuentes-Vicente, J. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: A review of biological and methodological factors in Mexican strains. *Acta Trop.* **195**, 51–57 (2019).
16. Losos, G. J. & Ikede, B. O. Review of Pathology of Diseases in Domestic and Laboratory Animals Caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodesiense* and *T.gambiense*. *Vet. Pathol.* **9**, 1689–1699 (1972).
17. Quarcoo, D. & Bundschuh, M. Chagas-Krankheit: Eine vernachlässigte tropische Erkrankung mit globalem Status. *Zentralblatt für Arbeitsmedizin, Arbeitsschutz und Ergon.* **65**, 217–219 (2015).
18. Malvy, D. & Cahppuis, F. Sleeping Sickness. *Clin Microbiol Infect* **17**, 986–995 (2011).

19. Hajduk, S. L. *et al.* Lysis of *Trypanosoma brucei* by a toxic subspecies of human high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **264**, 5210–5217 (1989).
20. Raper, J., Fung, R., Ghiso, J., Nussenzweig, V. & Tomlinson, S. Characterization of a novel trypanosome lytic factor from human serum. *Infect. Immun.* **67**, 1910–1916 (1999).
21. Rifkin, M. R. Identification of the trypanocidal factor in normal human serum: high density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 3450–3454 (1978).
22. Vanhollebeke, B. *et al.* A Haptoglobin-Hemoglobin Receptor Conveys Innate Immunity to *Trypanosoma brucei* in Humans. *Science (80-)*. **320**, 677–681 (2008).
23. Bullard, W. *et al.* Haptoglobin-hemoglobin receptor independent killing of African trypanosomes by human serum and trypanosome lytic factors. *Virulence* **3**, 72–76 (2012).
24. Pérez-Morga, D. *et al.* Microbiology: Apolipoprotein L-I promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes. *Science (80-)*. **309**, 469–472 (2005).
25. Oli, M. W., Cotlin, L. F., Shiflett, A. M. & Hajduk, S. L. Serum resistance-associated protein blocks lysosomal targeting of trypanosome lytic factor in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot. Cell* **5**, 132–139 (2006).
26. Vanhamme, L. *et al.* Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* **422**, 83–87 (2003).
27. Alsford, S., Currier, R. B., Guerra-Assunção, J. A., Clark, T. G. & Horn, D. Cathepsin-L Can Resist Lysis by Human Serum in *Trypanosoma brucei brucei*. *PLoS Pathog.* **10**, 1–12 (2014).
28. Santos, C. C., Coombs, G. H., Lima, A. P. C. A. & Mottram, J. C. Role of the *Trypanosoma brucei* natural cysteine peptidase inhibitor ICP in differentiation and virulence. *Mol. Microbiol.* **66**, 991–1002 (2007).
29. Stephens, N. A. & Hajduk, S. L. Endosomal localization of the serum resistance-associated protein in African trypanosomes confers human infectivity. *Eukaryot. Cell* **10**, 1023–1033 (2011).
30. McCulloch, R. *et al.* Emerging challenges in understanding trypanosome antigenic variation. *Emerg. Top. Life Sci.* **1**, 585–592 (2017).
31. Chaves, I., Rudenko, G., Dirks-Mulder, A., Cross, M. & Borst, P. Control of variant surface glycoprotein gene-expression sites in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **18**, 4846–4855 (1999).
32. Pays, E., Lips, S., Nolan, D., Vanhamme, L. & Pérez-Morga, D. The VSG expression sites of *Trypanosoma brucei*: Multipurpose tools for the adaptation of the parasite to mammalian hosts. *Mol. Biochem. Parasitol.* **114**, 1–16 (2001).
33. Moreno, C. J. G., Temporão, A., Torres, T. & Silva, M. S. *Trypanosoma brucei* interaction with host: Mechanism of VSG release as target for drug discovery for african trypanosomiasis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–10 (2019).
34. Engstler, M. *et al.* Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **117**, 1105–1115 (2004).
35. Engstler, M. *et al.* Hydrodynamic Flow-Mediated Protein Sorting on the Cell Surface of Trypanosomes. *Cell* **131**, 505–515 (2007).
36. Field, M. C. & Carrington, M. The trypanosome flagellar pocket. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 775–786 (2009).

37. Steverding, D. The transferrin receptor of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Int.* **48**, 191–198 (2000).
38. Mackey, Z. B., O'Brien, T. C., Greenbaum, D. C., Blank, R. B. & McKerrow, J. H. A cathepsin B-like protease is required for host protein degradation in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **279**, 48426–48433 (2004).
39. Steverding, D. *et al.* *Trypanosoma brucei*: Chemical evidence that cathepsin L is essential for survival and a relevant drug target. *Int. J. Parasitol.* **42**, 481–488 (2012).
40. Pal, A., Hall, B. S., Jeffries, T. R. & Field, M. C. Rab5 and Rab11 mediate transferrin and anti-variant surface glycoprotein antibody recycling in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* **374**, 443–451 (2003).
41. Taylor, M. C., Mclatchie, A. P. & Kelly, J. M. Evidence that transport of iron from the lysosome to the cytosol in African trypanosomes is mediated by a mucolipin orthologue. *Mol. Microbiol.* **89**, 420–432 (2013).
42. Nikolskaia, O. V. *et al.* Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. *J. Clin. Invest.* **116**, 2739–2747 (2008).
43. Grab, D. J. *et al.* Protease activated receptor signaling is required for African trypanosome traversal of human brain microvascular endothelial cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, 1–13 (2009).
44. Schomburg, D. & Schomburg, I. *Enzyme Databases. Springer Protocols - Methods in Molecular Biology 609* (2010). doi:10.1007/978-1-60327-241-4.
45. Rogers, L. D. & Overall, C. M. C. Proteolytic post-translational modification of proteins: Proteomic tools and methodology. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 3532–3542 (2013).
46. Boonen, S., Rosenberg, E., Claessens, F., Vanderschueren, D. & Papapoulos, S. Inhibition of cathepsin K for treatment of osteoporosis. *Curr. Osteoporos. Rep.* **10**, 73–79 (2012).
47. Turk, B. Targeting proteases: Successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 785–799 (2006).
48. Sukharev, S. A., Pleshakova, O. V. & Sadovnikov, V. B. Role of proteases in activation of apoptosis. *Cell Death Differ.* **4**, 457–462 (1997).
49. Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **40**, 343–350 (2012).
50. Kerr, I. D., Wu, P., Marion-Tsukamaki, R., Mackey, Z. B. & Brinen, L. S. Crystal structures of TbCatB and rhodesain, potential chemotherapeutic targets and major cysteine proteases of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, 1–9 (2010).
51. Abdulla, M.-H. *et al.* RNA interference of *Trypanosoma brucei* cathepsin B and L affects disease progression in a mouse model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**, 1–6 (2008).
52. Caffrey, C. R. & Steverding, D. Kinetoplastid papain-like cysteine peptidases. *Mol. Biochem. Parasitol.* **167**, 12–19 (2009).
53. Stoka, V., Turk, V. & Turk, B. Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Res. Rev.* **32**, 22–37 (2016).
54. Casey, J. R., Grinstein, S. & Orłowski, J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 50–61 (2010).
55. Kornfeld, S. Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J.* **1**, 462–468 (1987).

56. Cazzulo, J. J., Hellmann, U., Curso, R. & Parodi, J. a. Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Absence of phosphorylated mannose residues. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**, 41–48 (1990).
57. Canuel, M., Korkidakis, A., Konnyu, K. & Morales, C. R. Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**, 292–297 (2008).
58. Marcusson, E. G., Horazdovsky, B. F., Cereghino, J. L., Gharakhanian, E. & Emr, S. D. The Sorting Receptor for Yeast Vacuolar Carboxypeptidase Y Is Encoded by the VPS10 Gene. *Cell* **77**, 579–586 (1994).
59. Tazeh, N. N. *et al.* Role of AP-1 in Developmentally Regulated Lysosomal Trafficking in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot. Cell* **8**, 1352–1361 (2009).
60. Costa-Pinto, D., Trindade, L. S., McMahon-Pratt, D. & Traub-Cseko, Y. M. Cellular trafficking in trypanosomatids: A new target for therapies? *Int. J. Parasitol.* **31**, 537–544 (2001).
61. Huete-Pérez, J. A., Engel, J. C., Brinen, L. S., Mottram, J. C. & McKerrow, J. H. Protease trafficking in two primitive eukaryotes is mediated by a prodomain protein motif. *J. Biol. Chem.* **274**, 16249–16256 (1999).
62. Nishimura, Y., Kawabata, T., Furuno, K. & Kato, K. Evidence that aspartic proteinase is involved in the proteolytic processing event of procathepsin L in lysosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 400–406 (1989).
63. Nishimura, Y., Kawabata, T. & Kato, K. Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: Characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* **261**, 64–71 (1988).
64. Wiederanders, B. & Kirschke, H. The Processing of a Cathepsin L Precursor in Vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* **272**, 516–521 (1989).
65. McDonald, J. K. & Kadkhodayan, S. CATNEPSIN L- A LATENT PROTEINASE IN GUINEA PIG SPERM. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**, 827–835 (1988).
66. Ménard, R. *et al.* Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin L: Contribution of both intermolecular and unimolecular events in the processing of procathepsin L in vitro. *J. Biol. Chem.* **273**, 4478–4484 (1998).
67. Mason, R. W., Gal, S. & Gottesman, M. M. The identification of the major excreted protein (MEP) from a transformed mouse fibroblast cell line as a catalytically active precursor form of cathepsin L. *Biochem. J.* **248**, 449–454 (1987).
68. Caglic, D., Pungerc, J. R., Pejler, G., Turk, V. & Turk, B. Glycosaminoglycans Facilitate Procathepsin B Activation through Disruption of Propeptide-Mature Enzyme Interactions. *J. Biol. Chem.* **282**, 33076–33085 (2007).
69. Serveau, C., Boulangé, A., Gauthier, F., Authié, E. & Lalmanach, G. Procongopain from *Trypanosoma congolense* Is Processed at Basic pH. *Biol. Chem.* **384**, 921–927 (2003).
70. Mason, R. W. & Massey, S. D. Surface activation of pro-cathepsin L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 1659–1666 (1992).
71. Mach, L., Mort, J. S. & Glössl, J. Maturation of human procathepsin B. *J. Biol. Chem.* **269**, 13030–13035 (1994).
72. Jerala, R., Zerovnik, E., Kidric, J. & Turk, V. pH-induced Conformational Transitions of the Propeptide of Human Cathepsin L. *J. Biol. Chem.* **273**, 11498–11504 (1998).

73. Smith, S. M. & Gottesman, M. M. Activity and deletion analysis of recombinant human cathepsin L expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 20487–20495 (1989).
74. Eakin, A. E., Mills, A. A., Harth, G., McKerrow, J. H. & Craik, C. S. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **267**, 7411–7420 (1992).
75. Tao, K., Stearns, A., Dong, J., Wu, Q. & Sahagian, G. G. The Proregion of Cathepsin L is Required for Proper Folding, Stability and ER Exit. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 19–27 (1994).
76. Sijwali, P. S., Shenai, B. R. & Rosenthal, P. J. Folding of the *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2 is mediated by a chaperone-like peptide and not the prodomain. *J. Biol. Chem.* **277**, 14910–14915 (2002).
77. Dutta, S., Choudhury, D., Roy, S., Dattagupta, J. K. & Biswas, S. Mutation in the Pro-Peptide Region of a Cysteine Protease Leads to Altered Activity and Specificity — A Structural and Biochemical Approach. *PLoS One* **28**, 1–19 (2016).
78. Shinde, U. & Inouye, M. Intramolecular chaperones: Polypeptide extensions that modulate protein folding. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**, 35–44 (2000).
79. Carmona, E. *et al.* Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. *Biochemistry* **35**, 8149–8157 (1996).
80. Taylor, M. A. J. *et al.* Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinase iv are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes. *Protein Eng. Des. Sel.* **8**, 59–62 (1995).
81. Reis, F. C. G. *et al.* The propeptide of cruzipain - A potent selective inhibitor of the trypanosomal enzymes cruzipain and brucipain, and of the human enzyme cathepsin F. *FEBS J.* **274**, 1224–1234 (2007).
82. Mottram, J. C., North, M. J., Barry, J. D. & Coombs, G. H. A cysteine proteinase cDNA from *Trypanosoma brucei* predicts an enzyme with an unusual C-terminal extension. *FEBS Lett.* **258**, 211–215 (1989).
83. Martínez, J., Henriksson, J., Rydåker, M., JoséCazzulo, J. & Pettersson, U. Genes for cysteine proteinases from *Trypanosoma rangeli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**, 135–141 (1995).
84. Fish, Wallace, R. *et al.* Primary structure and partial characterization of a life-cycle-regulated cysteine protease from *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*. *Gene* **161**, 125–128 (2010).
85. Vernet, T. *et al.* Processing of the papain precursor. The ionization state of a conserved amino acid motif within the pro region participates in the regulation of intramolecular processing. *Journal of Biological Chemistry* vol. 270 10838–10846 (1995).
86. Groves, M. R., Coulombe, R., Jenkins, J. & Cygler, M. Structural basis for specificity of papain-like cysteine protease proregions toward their cognate enzymes. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **32**, 504–514 (1998).
87. Aich, P. & Biswas, S. Highly Conserved Arg Residue of ERFNIN Motif of Pro-Domain is Important for pH-Induced Zymogen Activation Process in Cysteine Cathepsins K and L. *Cell Biochem. Biophys.* **76**, 219–229 (2018).
88. Sundararaj, S. *et al.* The Ionic and Hydrophobic Interactions Are Required for the Auto Activation of Cysteine Proteases of *Plasmodium falciparum*. **7**, 1–9 (2012).
89. Kreuzsch, S. *et al.* An evolutionarily conserved tripartite tryptophan motif stabilizes the

- prodomains of cathepsin L-like cysteine proteases. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2965–2972 (2000).
90. Groves, M. R. *et al.* The prosequence of procaricain forms an α -helical domain that prevents access to the substrate-binding cleft. *Structure* **4**, 1193–1203 (1996).
 91. Rzychon, M., Chmiel, D. & Stec-Niemczyk, J. Modes of inhibition of cysteine proteases Circed white star. *Acta Biochim. Pol.* **51**, 861–873 (2004).
 92. Otto, H. H. & Schirmeister, T. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* **97**, 133–171 (1997).
 93. Lewis, S. D., Johnson, F. A. & Shafer, J. A. Effect of Cysteine-25 on the Ionization of Histidine-159 in Papain As Determined by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Evidence for a His-159-Cys-25 Ion Pair and Its Possible Role in Catalysis. *Biochemistry* **20**, 48–51 (1981).
 94. Vernet, T. *et al.* Structural and Functional Roles of Asparagine 175 in The Cysteine Protease Papain. *Jour* **270**, 16645–16652 (1995).
 95. Hol, W. G. J., Van Duijnen, P. T. & Berendsen, H. J. C. The α -helix dipole and the properties of proteins. *Nature* **273**, 443–446 (1978).
 96. Mladenovic, M., Fink, R. F., Thiel, W., Schirmeister, T. & Engels, B. On the origin of the stabilization of the zwitterionic resting state of cysteine proteases: A theoretical study. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 8696–8705 (2008).
 97. Verma, S., Dixit, R. & Pandey, K. C. Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Front. Pharmacol.* **7**, 1–12 (2016).
 98. Harper, E. & Berger, A. On the size of the active site in proteases: Pronase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 1956–1960 (1972).
 99. Choe, Y. *et al.* Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *J. Biol. Chem.* **281**, 12824–12832 (2006).
 100. Kerr, I. D. *et al.* Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. *J. Biol. Chem.* **284**, 25697–25703 (2009).
 101. Caffrey, C. R. *et al.* Active site mapping, biochemical properties and subcellular localization of rhodesain, the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei* rhodesiense. *Mol. Biochem. Parasitol.* **118**, 61–73 (2001).
 102. Kirschke, H., Langner, J., Wiederanders, B., Ansorge, S. & Bohley, P. Cathepsin L A New Proteinase from Rat-Liver Lysosomes Heidrun. *Eur. J. Biochem.* **301**, 293–301 (1977).
 103. Lalmanach, G. *et al.* Congopain from *Trypanosoma congolense*: Drug target and vaccine candidate. *Biol. Chem.* **383**, 739–749 (2002).
 104. Jung, S. Rational Design , Synthesis and Evaluation of Covalent Rhodesain Inhibitors. *Dissertation, Johannes Gutenberg-University* (2018).
 105. Bauer, R. A. Covalent inhibitors in drug discovery: From accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discov. Today* **20**, 1061–1073 (2015).
 106. Bradshaw, J. M. *et al.* Prolonged and tunable residence time using reversible covalent kinase inhibitors. *Nat Chem Biol.* **11**, 525–531 (2015).
 107. Copeland, R. A., Pompliano, D. L. & Meek, T. D. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 730–739 (2006).

108. Ghosh, A. K., Samanpta, I., Mondal, A. & Liu, W. R. Covalent Inhibition in Drug Discovery. *ChemMedChem* **14**, 889–906 (2019).
109. Olbe, L., Carlsson, E. & Lindberg, P. A proton-pump inhibitor expedition: The case histories of omeprazole and esomeprazole. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 132–139 (2003).
110. Endoh, T. *et al.* Inhibition by acetylsalicylic acid, a cyclo-oxygenase inhibitor, and p-bromophenacylbromide, a phospholipase A 2 inhibitor, of both cirrhosis and enzyme-altered nodules caused by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet in rats. *Carcinogenesis* **17**, 467–475 (1996).
111. Wright, P., I., S. & Myers, A. G. The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery. *Angew Chem Int Ed Engl.* **53**, 8840–8869 (2014).
112. Cox, D. A., Fesik, S. W., Kimmelman, A. C., Luo, J. & Der, C. J. Drugging the undruggable Ras. *Nat re* **13**, 828–851 (2014).
113. Conde, S., Perez, D. I., Martinez, A., Perez, C. & Moreno, F. J. Thienyl and Phenyl α -Halomethyl Ketones: New Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase (GSK-3) from a Library of Compound Searching Santiago. *J. Med. Chem.* **46**, 4631–4633 (2003).
114. Ambroso, J. L. & Harris, C. In vitro embryotoxicity of the cysteine proteinase inhibitors benzyloxycarbonyl-phenylalanine-alanine-diazomethane (Z-Phe-Ala-CHN₂) and benzyloxycarbonyl-phenylalanine-phenylalanine-diazomethane (Z-Phe-Phe-CHN₂). *Teratology* **50**, 214–228 (1994).
115. Albeck, A. & Kliper, S. Mechanism of cysteine protease inactivation by peptidyl epoxides. *Biochem. J.* **322**, 879–884 (1997).
116. Thompson, R. C. Peptide Aldehydes: Potent Inhibitors of Serine and Cysteine Proteases. *Methods Enzymol.* **46**, 220–225 (1977).
117. Schröder, J. *et al.* Identification of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Triazine Nitriles as Inhibitors of *Leishmania mexicana* Cysteine Protease CPB. *PLoS One* **8**, 1–12 (2013).
118. Quesne, M. G., Ward, R. A. & de Visser, S. P. Cysteine protease inhibition by nitrile-based inhibitors: A computational study. *Front. Chem.* **1**, 1–10 (2013).
119. Palmer, J. T., Rasnick, D., Klaus, J. L. & Brömme, D. Vinyl Sulfones as Mechanism-Based Cysteine Protease Inhibitors. *J. Med. Chem.* **38**, 3193–3196 (1995).
120. Gao, J. & Bandyopadhyay, A. Targeting Biomolecules with Reversible Covalent Chemistry. *Curr Opin Chem Biol* **176**, 139–148 (2017).
121. Schirmeister, T. *et al.* Quantum Chemical-Based Protocol for the Rational Design of Covalent Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 8332–8335 (2016).
122. Latorre, A. *et al.* Dipeptidyl Nitroalkenes as Potent Reversible Inhibitors of Cysteine Proteases Rhodesain and Cruzain. *ACS Med. Chem. Lett.* **7**, 1073–1076 (2016).
123. Yung-Chi, C. & Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108 (1973).
124. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818–822 (1990).
125. Sherwood, A. V. & Henkin, T. M. Riboswitch-Mediated Gene Regulation: Novel RNA Architectures Dictate Gene Expression Responses. *Annu. Rev. Microbiol.* **70**, 361–374 (2016).

126. Zhou, J. & Rossi, J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 181–202 (2017).
127. Kaur, H., Bruno, J. G., Kumar, A. & Sharma, T. K. Aptamers in the therapeutics and diagnostics pipelines. *Theranostics* **8**, 4016–4032 (2018).
128. Bock, L. C., Griffin, L. C., Latham, J. A., Vermaas, E. H. & Toole, J. J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* **355**, 564–566 (1992).
129. Pastor, F. *et al.* CD28 aptamers as powerful immune response modulators. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2**, 1–9 (2013).
130. Cheng, C., Chen, Y. H., Lennox, K. A., Behlke, M. A. & Davidson, B. L. In vivo SELEX for identification of brain-penetrating aptamers. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2**, 1–9 (2013).
131. Lakhin, A. V., Tarantul, V. Z. & Gening, L. V. Aptamers: Problems, solutions and prospects. *Acta Naturae* **5**, 34–43 (2013).
132. Haruta, K. *et al.* A Novel PEGylation Method for Improving the Pharmacokinetic Properties of Anti-Interleukin-17A RNA Aptamers. *Nucleic Acid Ther.* **27**, 36–44 (2017).
133. Ni, S. *et al.* Chemical modifications of nucleic acid aptamers for therapeutic purposes. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1682–1683 (2017).
134. Kasahara, Y. *et al.* Effect of 3'-end capping of aptamer with various 2',4'-bridged nucleotides: Enzymatic post-modification toward a practical use of polyclonal aptamers. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **20**, 1626–1629 (2010).
135. Shaw, Jeng, P., Kent, K., Bird, J., Fishback, J. & Froehler, B. Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum. *Nucleic Acids Res.* **19**, 747–750 (1991).
136. Yan, X., Gao, X. & Zhang, Z. Isolation and characterization of 2'-amino-modified RNA aptamers for human TNF α . *Genomics, proteomics Bioinforma. / Beijing Genomics Inst.* **2**, 32–42 (2004).
137. Li, N., Nguyen, H. H., Byrom, M. & Ellington, A. D. Inhibition of cell proliferation by an Anti-EGFR aptamer. *PLoS One* **6**, 1–10 (2011).
138. Lebars, I., Richard, T., Di Primo, C. & Toulmé, J. J. LNA derivatives of a kissing aptamer targeted to the trans-activating responsive RNA element of HIV-1. *Blood Cells, Mol. Dis.* **38**, 204–209 (2007).
139. Kourlas, H. & Schiller, D. S. Pegaptanib sodium for the treatment of neovascular age-related macular degeneration: A review. *Clin. Ther.* **28**, 36–44 (2006).
140. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (80-)*. **249**, 505–510 (1990).
141. Homann, M. & Göringer, H. U. Uptake and intracellular transport of RNA aptamers in African trypanosomes suggest therapeutic 'Piggy-Back' approach. *Bioorganic Med. Chem.* **9**, 2571–2580 (2001).
142. Homann, M. & Göringer, H. U. Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2006–2014 (1999).
143. Leeder, W. M., Giehler, F., Joswig, J. & Göringer, H. U. Bioinspired Design of Lysolytic Triterpenoid–Peptide Conjugates that Kill African Trypanosomes. *ChemBioChem* **20**, 1251–1255 (2019).

144. Adler, A. Die post-SELEX Optimierung des Trypanosomen- spezifischen RNA- Aptamers 2-16. *Dissertation, TU Darmstadt* (2007).
145. Kesselring, J. Rationales Design , Synthese und Testung kovalent- reversibler Cysteinproteaseinhibitoren. *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität* (2017).
146. Matthias Leyh. Strukturbiologische Experimente zur Charakterisierung von Rhodesain im Komplex mit Inhibitoren im Rahmen der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung gegen den Erreger der Schlafkrankheit. *Dissertation, Universität Würzburg* (2009).
147. Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B. & Harvey, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**, 249–270 (2005).
148. Koeller, C. M. & Bangs, J. D. Processing and targeting of cathepsin L (TbCatL) to the lysosome in *Trypanosoma brucei*. *Cell. Microbiol.* **21**, 1–16 (2019).
149. Carugo, O. Maximal B-factors in protein crystal structures. *Zeitschrift fur Krist. - Cryst. Mater.* **234**, 73–77 (2019).
150. Urzhumtsev, A., Afonine, P. V., Lunin, V. Y., Terwilliger, T. C. & Adams, P. D. Metrics for comparison of crystallographic maps. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **70**, 2593–2606 (2014).
151. Rajan, R. & Balaram, P. A model for the interaction of trifluoroethanol with peptides and proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.* **48**, 328–336 (1996).
152. Kentsis, A. & Sosnick, T. R. Trifluoroethanol promotes helix formation by destabilizing backbone exposure: Desolvation rather than native hydrogen bonding defines the kinetic pathway of dimeric coiled coil folding. *Biochemistry* **37**, 14613–14622 (1998).
153. Wallace, B. A. Synchrotron radiation circular-dichroism spectroscopy as a tool for investigating protein structures. *J. Synchrotron Radiat.* **7**, 289–295 (2000).
154. Hellmann, N. & Schneider, D. Hands On: Using Tryptophan Fluorescence Spectroscopy to Study Protein Structure. in *Protein Supersecondary Structures* vol. 1958 379–401 (2019).
155. Reif, M. M., MacH, L. & Oostenbrink, C. Molecular insight into propeptide-protein interactions in cathepsins L and O. *Biochemistry* **51**, 8636–8653 (2012).
156. Jiang, L. & Lai, L. CH...O hydrogen bonds at protein-protein interfaces. *J. Biol. Chem.* **277**, 37732–37740 (2002).
157. Spicer, C. D. & Davis, B. G. Selective chemical protein modification. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
158. Wagner, A. *et al.* Inhibitor-Induced Dimerization of an Essential Oxidoreductase from African Trypanosomes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **58**, 3640–3644 (2019).
159. Nguyen, H. H., Park, J., Kang, S. & Kim, M. Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications. *Sensors* **15**, 10481–10510 (2015).
160. Duhr, S. & Braun, D. Why molecules move along a temperature gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 19678–19682 (2006).
161. Jerabek-Willemsen, M. *et al.* MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J. Mol. Struct.* **1077**, 101–113 (2014).
162. Su, H. & Xu, Y. Application of ITC-based characterization of thermodynamic and kinetic association of ligands with proteins in drug design. *Front. Pharmacol.* **9**, 1–7 (2018).
163. Dumas, P. *et al.* Extending ITC to Kinetics with kinITC. *Methods Enzymol.* **567**, 157–

- 180 (2016).
164. Bianconi, M. L. Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions. *Biophys. Chem.* **126**, 59–64 (2007).
165. Goldberg, R. N., Kishore, N. & Lennen, R. M. Thermodynamic quantities for the ionization reactions of buffers. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **31**, 231–370 (2002).
166. Doose, S., Neuweiler, H. & Sauer, M. Fluorescence quenching by photoinduced electron transfer: A reporter for conformational dynamics of macromolecules. *ChemPhysChem* **10**, 1389–1398 (2009).
167. Sauer, M. & Neuweiler, H. Probing Rapid Structural Fluctuations of Proteins and Nucleic Acids by Single-Molecule Fluorescence Quenching. *Fluoresc. Spectrosc. Microsc.* **1076**, 371–417 (2014).
168. Pace, C. N., Heinemann, U., Hahn, U. & Saenger, W. Ribonuclease T1: Structure, Function, and Stability. *Angew Chem Int Ed Engl.* **30**, 343–360 (1991).
169. Studier, F. W. & Moffatt, B. A. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *J. Mol. Biol.* 113–130 (1986).
170. Duan, B., Wu, S., Da, L. T. & Yu, J. A critical residue selectively recruits nucleotides for T7 RNA polymerase transcription fidelity control. *Biophys. J.* **107**, 2130–2140 (2014).
171. Huang, Y., Eckstein, F., Padilla, R. & Sousa, R. Mechanism of ribose 2'-group discrimination by an RNA polymerase. *Biochemistry* **36**, 8231–8242 (1997).
172. Breuning, A. *et al.* Michael acceptor based antiplasmodial and antitrypanosomal cysteine protease inhibitors with unusual amino acids. *J. Med. Chem.* **53**, 1951–1963 (2010).
173. Schirmeister, T. & Klockow, A. Cysteine Protease Inhibitors Containing Small Rings. *Mini-Reviews Med. Chem.* **3**, 585–596 (2005).
174. Powers, J. C., Asgian, J. L. & James, K. E. Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. *Chem. Rev.* **102**, 4639–4750 (2002).
175. Walker, B. & Lynas, J., F. Strategies for the inhibition of serine proteases. *C. Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 596–624 (2001).
176. Siklos, M., BenAissa, M. & Thatcher, G. R. J. Cysteine proteases as therapeutic targets: Does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 506–519 (2015).
177. Machon, U. *et al.* On-bead screening of a combinatorial fumaric acid derived peptide library yields antiplasmodial cysteine protease inhibitors with unusual peptide sequences. *J. Med. Chem.* **52**, 5662–5672 (2009).
178. Klein, P. *et al.* New Cysteine Protease Inhibitors : Electrophilic (Het) arenes and Unexpected Prodrug Identification for the Trypanosoma Protease Rhodesain. *Molecules* **25**, 1–23 (2020).
179. Sudhan, D. R. & Siemann, D. W. Cathepsin L targeting in cancer treatment. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2017).
180. Rehm, D. & Weller, A. Kinetik und Mechanismus der Elektronübertragung bei der Fluoreszenzlöschung in Acetonitril. *Berichte der Bunsengesellschaft für Phys. Chemie* **73**, 834–839 (1969).
181. Vaiana, A. C. *et al.* Fluorescence Quenching of Dyes by Tryptophan: Interactions at

- Atomic Detail from Combination of Experiment and Computer Simulation. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14564–14572 (2003).
182. Li, X., Zhu, R., Yu, A. & Zhao, X. S. Ultrafast photoinduced electron transfer between tetramethylrhodamine and guanosine in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B* **115**, 6265–6271 (2011).
 183. Schuler, B. & Hofmann, H. Single-molecule spectroscopy of protein folding dynamics-expanding scope and timescales. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 36–47 (2013).
 184. Doose, S. & Sauer, M. Biopolymere: PET-FCS zum Studium von Konformationsdynamik. *BioSpektrum* **13**, 384–385 (2007).
 185. Hess, S. T., Huang, S., Heikal, A. A. & Webb, W. W. Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: A review. *Biochemistry* **41**, 697–705 (2002).
 186. Haustein, E. & Schwille, P. Fluorescence correlation spectroscopy: Novel variations of an established technique. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 151–169 (2007).
 187. Neuweiler, H. & Sauer, M. Using Photoinduced Charge Transfer Reactions to Study Conformational Dynamics of Biopolymers at the Single-Molecule Level. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **5**, 285–298 (2005).
 188. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
 189. Leslie, A. G. W. Integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **55**, 1696–1702 (1999).
 190. Winn, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 235–242 (2011).
 191. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
	[REDACTED]
	[REDACTED]
	[REDACTED]
	[REDACTED]
	[REDACTED]
	[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
	[REDACTED]
	[REDACTED]
	[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
	[REDACTED]
	[REDACTED]
	[REDACTED]
	[REDACTED]
	[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
	[REDACTED]
	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]